

# Photodynamische Suppression von Enterococcus faecalis mit dem Photosensitizer mTHPC

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Stefan Kranz

geboren am 18.09.1983 in Bad Salzungen

Gutachter

1: Prof. Dr. Dr. Bernd Sigusch, Jena

2: PD Dr. Monika Schmidt, Jena

3: Prof. Dr. Volker Albrecht, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26.08.2013

# Verzeichnis der Abkürzungen

## Wortabkürzungen

Abk.	Erklärung
aPDT	antimikrobielle Photodynamische Therapie
CFU	colony forming units (koloniebildende Einheiten)
CHX	Chlorhexidin
DMPC	L- $\alpha$ -di-miristoyl-phosphatidyl-cholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium-methylsulfat
DPPC	DL- $\alpha$ -dipalmitoyl-phosphatidyl-cholin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E. faecalis	Enterococcus faecalis
KBE	koloniebildende Einheiten
mTHPC	5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin
OD	optical density (optische Dichte)
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
PS	Photosensitizer
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S. aureus	Staphylococcus aureus
SD	standard deviation (Standardabweichung)
S. mutans	Streptococcus mutans
S. sobrinus	Streptococcus sobrinus
WLBU2	kationisches Peptid, abgeleitet vom lytischen Peptid I des Lentivirus

# Physikalische Größen

Formelzeichen	Größe	Einheit
$l$	Länge	m
$m$	Masse	kg
$t$	Zeit	s
$n$	Stoffmenge	mol
$W$	Arbeit	J
$P$	Leistung	W
$\Delta\vartheta$	Temperaturdifferenz	K
$T$	Temperatur	°C
$M$	Molare Masse	kg/mol

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Die mikrobielle Infektion des Pulpa-Dentin- Systems . . . . .	3
2.2	Mikrobiologische Aspekte der persistierenden endodontischen Infektion .	4
2.2.1	Enterococcus faecalis . . . . .	6
2.3	Die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) . . . . .	7
2.3.1	Wirkungsweise . . . . .	8
2.3.2	Orale Anwendung der aPDT . . . . .	8
2.3.3	Der Photosensitizer mTHPC . . . . .	10
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Photodynamic suppression of Enterococcus faecalis using the photosensitizer mTHPC, Kranz S, Guellmar A, Völpele A, Gitter B, Albrecht V, Sigusch B, Lasers in Surgery and Medicine, 43, 241-248, 2011</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>48</b>
8.1	Danksagung . . . . .	48
8.2	Ehrenwörtliche Erklärung . . . . .	49

# 1 Zusammenfassung

Die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT) stellt eine innovative Behandlungsmethode zur Suppression von Mikroorganismen dar. Dabei beruht die antiseptische Wirkung dieser Therapieform auf dem zellschädigenden Potential von Singulett Sauerstoff bzw. verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies, die durch Bestrahlung eines Photosensitizers (PS) mit Licht einer geeigneten Wellenlänge gebildet werden.

Endodontische Infektionen mit der grampositiven Bakterienspezies *Enterococcus faecalis* führen häufig zu einem therapeutischen Problem. Diese Spezies, die oft bei therapierefraktären Wurzelkanalinfektionen nachgewiesen wird, verfügt über eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber zahlreichen intrakanalären Desinfektionsmitteln und Antibiotika. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bisher versucht, diese Spezies in infizierten Wurzelkanälen photodynamisch zu hemmen, allerdings nur mit eingeschränktem Erfolg. Neuartige Konzepte, die die Kopplung des Photosensitizers an eine geeignete Trägersubstanz beinhalten, sollen dazu beitragen, die Effizienz der aPDT nachhaltig zu steigern. In der vorliegenden Studie wurde die photodynamische Wirkung des hydrophoben PS 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC), angereichert in Liposomen, auf *E. faecalis* untersucht. Bei mTHPC handelt es sich um einen sehr potenten Photosensitizer, der bisher ausschließlich für die Photodynamische Therapie von nicht-melanomatösen Hauttumoren im Kopf- und Halsbereich zugelassen ist.

Nach der Herstellung einer eukaryotischen Suspension wurde *E. faecalis* mit liposomalem mTHPC in verschiedenen Konzentrationen (10, 30 und 50  $\mu\text{M}$ ) vermischt und für 15 min in völliger Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Ansätze mit rotem Laserlicht (652 nm, 100 J/cm<sup>2</sup>). Um zusätzlich den Einfluss der Lichtenergie auf die antibakterielle Wirkung der Methode zu untersuchen, wurde die bakterielle Suspension mit 50  $\mu\text{M}$  mTHPC inkubiert und anschließend mit 25, 50 und 75 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt. In den Kontrollgruppen wurde zudem die Auswirkung des Laserlichts (100 J/cm<sup>2</sup>) auf die bakterielle Wachstumsrate sowie die Dunkeltoxizität der einzelnen PS-Konzentrationen ermittelt. Nach der Behandlung erfolgte aus allen Ansätzen die Herstellung von Verdünnungsreihen und nach anaerober Kultivierung auf sterilem Schaedler-Agar (4 d) die

Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml). Des Weiteren wurde die Temperatur während der Bestrahlung der Suspension aufgezeichnet und der Einfluss der aPDT auf die bakterielle Zellwand fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Wie die Ergebnisse zeigen, konnte *E. faecalis* mit einer mTHPC-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  und einer Lichtenergiedichte von 100  $\text{J}/\text{cm}^2$  vollständig supprimiert werden. Die Applikation einer geringeren PS-Konzentration bzw. Lichtenergiedichte resultierte in einer signifikanten Abnahme der antibakteriellen Wirkung. Eine Behandlung mit 10 und 30  $\mu\text{M}$  mTHPC führte dennoch zu einer bakteriellen Reduktion um 5,8 bzw. 6,7 log-Schritte. Bei konstanter PS-Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) resultierte die Laserbestrahlung mit 25, 50 und 75  $\text{J}/\text{cm}^2$  in einer Reduktion der bakteriellen Wachstumsrate um 6,0; 6,3 bzw. 7,0 log-Schritte. Die Bestrahlung der bakteriellen Suspension ohne Photosensitizerzusatz hatte keinen Einfluss auf das Wachstum von *E. faecalis*. Nach der Dunkelinkubation der bakteriellen Suspension für 15 min mit 50  $\mu\text{M}$  mTHPC konnte in den Ansätzen eine Reduktion der KBE/ml um 1,5 log-Schritte nachgewiesen werden. Die Dunkelinkubation mit geringeren PS-Konzentrationen hatte keine signifikante bakterielle Suppression zur Folge. Während der Bestrahlung mit 100  $\text{J}/\text{cm}^2$  stieg die Temperatur in der Suspension um ca. 6 °C an. Des Weiteren konnte im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung nach der photodynamischen Behandlung ein vollständiger Integritätsverlust der bakteriellen Zellwand festgestellt werden.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, ist *E. faecalis* mit der liposomalen mTHPC-Formulierung in Verbindung mit rotem Laserlicht vollständig suppressierbar. Die antibakterielle Wirkung der Behandlung war hierbei von der PS-Konzentration und der eingestrahlten Lichtenergie abhängig. Die antiseptische Wirkung kann möglicherweise auf eine irreversible Schädigung der Zellwand zurückgeführt werden. Eine thermische Beeinträchtigung der Zellen ist auszuschließen, da durch die Bestrahlung der Suspension mit Laserlicht kein übermäßiger Temperaturanstieg nachgewiesen werden konnte. Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass mit der untersuchten liposomalen mTHPC-Formulierung (Foslipos) eine effiziente photodynamische Suppression von *E. faecalis* möglich ist.

## 2 Einleitung

In den letzten 20 Jahren hat die Zahl der endodontischen Behandlungen stetig zugenommen. Als Grund dafür werden die verbesserten technischen Voraussetzungen sowie die allgemein gestiegene Behandlungsqualität und das wachsende Bewusstsein der Bevölkerung für den Zahnerhalt angesehen. Die zahnmedizinische Behandlung von Verletzungen und Erkrankungen des Pulpa-Dentin-Systems ist dabei ein wesentlicher Bestandteil der Endodontologie. Die endodontische Behandlung umfasst alle Maßnahmen, die den Erhalt der erkrankten Pulpa gewährleisten und der Gesunderhaltung des periapikalen Gewebes dienen. Bei einer irreversiblen Schädigung des Pulpa-Dentin-Systems sollte durch eine adäquate Wurzelkanalbehandlung der funktionsfähige Zustand des Zahns wieder hergestellt werden.

### 2.1 Die mikrobielle Infektion des Pulpa-Dentin-Systems

Bei einer irreversiblen Schädigung des Pulpa-Dentin-Systems besteht die Notwendigkeit einer Wurzelkanalbehandlung. Als Auslöser für eine Pulpitis sind vor allem mikrobiologische, physikalische und chemische Noxen zu nennen. In der Literatur wird die Zahnkaries mit einer Prävalenz von über 90 % als häufigste Ursache der endodontischen Erkrankung angegeben (Schäfer 2001).

Nimmt die mikrobiologische Belastung der Pulpa übermäßig zu, kann das immunologische Abwehrsystem des Gewebes zum Erliegen kommen und sich in der Folge eine Pulpanekrose bzw. Gangrän entwickeln (Klimm 2011).

Mit dem fortschreitenden Gewebsuntergang wird das endodontische System dann meist vollständig durch die Mikroorganismen der Mundhöhle besiedelt. Dabei kommt es zum Aufbau einer Mischflora, bestehend aus grampositiven Bakterienspezies der Gattungen *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* sowie gramnegativen Bakterien der Genera *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Dialister*, *Veillonella* und *Cap-*



nocytophaga. Außerdem werden Hefen, insbesondere die Gattung *Candida* häufig nachgewiesen. Allerdings sind primäre Infektionen überwiegend von gramnegativen anaeroben schwarz pigmentierten Bakterienspezies dominiert (Haapasalo 1993, Gomes et al. 2004, Ruvière et al. 2007, Miranda et al. 2009, Siqueira und Rôças 2009, Ledezma-Rasillo et al. 2010, Ito et al. 2011).

Die endodontopathogene Spezies *Enterococcus faecalis* kommt bei solchen Läsionen lediglich in geringer Anzahl vor. Allerdings wird sie häufiger bei sekundären und persistierenden Infektionen nachgewiesen (Zehnder und Guggenheim 2009, Gomes et al. 2008). In Folge der mikrobiellen Kolonisation des endodontischen Systems wird ein bakterieller Biofilm aufgebaut, der die Dentininnenflächen einschließlich der Dentintubuli überzieht. Aufgrund der mikrobiellen Noxen reagiert auch das umliegende periapikale Gewebe mit einer Entzündungsreaktion. Durch mögliche akzessorische Seitenkanäle sowie über das Foramen apicale gelangen Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte sowie Zellbestandteile in die periapikale Region und lösen dort eine Immunreaktion aus (Siqueira und Rôças 2007).

Die akute Phase der apikalen Parodontitis wird klinisch von Schmerzen, erhöhter Berührungsempfindlichkeit und einer ödematös bedingten Zahnverlängerung begleitet. Röntgenologisch sind meist kaum Veränderungen oder nur ein unwesentlich verbreiteter Parodontalspalt zu erkennen.

Durch eine schlagartige Infiltration einer großen Anzahl Bakterien bzw. einer gleichzeitigen Reduktion der immunologischen Abwehr kann es im apikalen Gewebe zur Überlastung der Wirtsabwehr und zum Entstehen eines akuten periapikalen Abszesses kommen. Befinden sich die Wirtsabwehr und die einwirkende mikrobielle Noxe dagegen im Gleichgewicht, kommt es zur Ausbildung einer chronischen Entzündung. In der Regel besteht in diesen Fällen klinisch zunächst überwiegend eine Symptomlosigkeit. Im röntgenologischen Zufallsbefund kann sich allerdings bereits eine periapikale Aufhellung darstellen.

## **2.2 Mikrobiologische Aspekte der persistierenden endodontischen Infektion**

Das Ziel der chemomechanischen Aufbereitung des infizierten Wurzelkanalsystems besteht in einer vollständigen Entfernung von Mikroorganismen, entzündungsauslösenden Substanzen und nekrotischen Geweberesten. Wesentlicher Bestandteil des Aufbereitungsverfahrens ist dabei die mechanische Instrumentation des Kanalsystems, die von alternierenden Spülungen mit gewebsauflösenden und antiseptischen Substanzen beglei-

tet wird (Stewart 1955, Martin 1991, Siqueira et al. 2002, Basrani 2011). Durch die mechanische Behandlung wird dem Kanallumen eine Form verliehen, die eine bakterien-dichte Obturation mit einem biologisch inerten Material ermöglicht. Bis zum Zeitpunkt der Wurzelkanalfüllung kann durch antiinfektiöse Zwischeneinlagen eine zusätzliche desinfizierende Wirkung erzielt werden (Athanasiadis et al. 2007, Kawashima et al. 2009). Trotz der durchgeführten Maßnahmen ist es aber möglich, dass Mikroorganismen in Isthmen, akzessorischen Seitenkanälen sowie in nicht aufbereiteten Kanälen oder anderen anatomischen Irregularitäten verbleiben und eine sekundäre Infektion des Wurzelkanalsystems hervorrufen (Lin et al. 1991, Siqueira et al. 1996, Siqueira 2001, Nair et al. 2005).

Wie bereits Sjögren et al. in einer Studie mit 55 infizierten Wurzelkanälen nachweisen konnte, führte das Verbleiben von Bakterien zum Zeitpunkt der Kanalobturation in 33 % der Fälle zu einer Persistenz der apikalen Parodontitis. Ein zuvor negativ ausgefallener Kulturnachweis resultierte in einem Misserfolg von lediglich 3 % (Sjögren et al. 1997). Eine persistierende endodontische Infektion wird von residualen Mikroorganismen hervorgerufen und zeigt sich letztlich in der Refraktärität der Therapie. Als klinische Merkmale werden in solchen Fällen Exudationen im Bereich von Fistelgängen sowie die Exazerbation chronischer apikaler Parodontitiden mit der entsprechenden Symptomatik diagnostiziert. Als Ursache wird inzwischen die Bildung von intrakanalären Biofilmen diskutiert, die eine höhere Resistenz gegenüber den antimikrobiellen Maßnahmen aufweisen (Nair et al. 2005).

Einige Spezies besitzen die Fähigkeit, weit in die Dentintubuli zu penetrieren und sind daher für desinfizierende Maßnahmen wenig zugänglich (Love et al. 1997, Parmar et al. 2011).

Außerdem ist bekannt, dass die antiseptischen Spüllösungen und Zwischeneinlagen durch Kontakt mit dem Dentin oder Serumbestandteilen neutralisiert werden können. Dies kann einen Verlust der antimikrobiellen Wirkung nach sich ziehen (Portenier et al. 2001). Verbliebene Gewebereste oder das Eindringen von Serumexudat und Speichelbestandteilen (Mikroleakage) aufgrund insuffizienter Füllungen können die mikrobiologische Proliferation zusätzlich begünstigen. Die wenigen im obturierten Kanal noch vorhandenen Nährstoffe befähigen die Mikroorganismen zudem, über spezielle molekulargenetische Regelmechanismen Stickstoff, Phosphat und Kohlenstoff aus anderen Nährstoffquellen zu beziehen (Siqueira und Rôças 2008).

Im Gegensatz zu primären Infektionen werden persistierende endodontische Infektionen überwiegend durch grampositive Bakterienspezies hervorgerufen. Häufig können dabei

Enterokokken, Streptokokken, Laktobazillen, Aktinomyceten, Peptostreptokokken, Propionibakterien sowie Sprosspilze der Spezies *Candida* nachgewiesen werden (Siqueira und Rôças 2004, Peciulienė et al. 2008). In den meisten, speziell auch therapierefraktären Fällen, dominiert jedoch die grampositive Bakterienspezies *Enterococcus faecalis* (Peciulienė et al. 2000, Gomes et al. 2008, Schirrmeister et al. 2009, Rôças und Siqueira 2012).

### 2.2.1 *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* ist eine grampositive, nicht sporenbildende, fakultativ anaerobe Bakterienspezies, die den Gastrointestinaltrakt des Menschen und verschiedener höherer Wirbeltiere besiedelt. Aktuell wird die Gattung in die Familie der Enterococcaceae und in die Ordnung der Lactobacillales eingeordnet. Enterokokken weisen eine ovoide Form auf und können als einzelne Zellen, gepaart oder in kurzen Ketten vorkommen. Als allgemeine Charakterisierungsmerkmale dieser Gattung gilt ein Wachstum bei Temperaturen zwischen 5 und 50 °C sowie bei pH-Werten bis zu 9,9.

*E. faecalis* kann außerdem Temperaturbehandlungen von 60 °C für 30 min und die Anwesenheit von 40 % Galle und 6,5 % NaCl überleben (Moreno et al. 2006, Fisher und Phillips 2009).

Alle Spezies der Gattung weisen aufgrund fehlender Cytochrome keine Oxidase- und Katalaseaktivitäten auf und tragen das spezifische Antigen der Lancefield-Gruppe D (Facklam et al. 2002, Kayser et al. 2010).

Enterokokken wurden lange Zeit als nur gering pathogen eingestuft und sind mittlerweile aber mit einer Häufigkeit von ca. 12 % die zweit- bis drittwichtigste Erregerart nosokomialer Infektionen (Klare et al. 2010).

*E. faecalis* ist hierbei für 70-95 % aller von Enterokokken verursachten Erkrankungen beim Menschen verantwortlich und löst bei hospitalisierten Patienten Harnwegsinfektionen, Endokarditiden, Bakteriämien, Wundinfektionen, Peritonitiden und Infektionen der oberen Atemwege aus (Klare et al. 2003, Jones et al. 2004, Klare et al. 2010). Zudem besteht eine Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine, Aminoglycoside, Glycopeptide und diverse andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Marothi et al. 2005).

*E. faecalis* gehört nicht zur kommensalen mikrobiologischen Gemeinschaft der Mundhöhle und wird beim oral Gesunden nur selten nachgewiesen (Aas et al. 2005, Zehnder und Guggenheim 2009).

Wie eine Studie von Sedgley et al. zeigt, konnte diese Spezies bei 100 oral gesunden

Probanden lediglich nur zu einem Prozent nachgewiesen werden, wobei die gleiche Anzahl von Patienten mit Wurzelkanalbehandlungen zu 11 % infiziert waren (Sedgley et al. 2004).

*E. faecalis* ist ein opportunistischer Erreger und wird im oralen Milieu bei persistierenden Wurzelkanalinfektionen nachgewiesen. Je nach angewandter Nachweismethode liegt die Prävalenz dabei zwischen 22 % und 70 % (Siqueira und Rôças 2004, Fouad et al. 2005, Nair 2006).

Im Vergleich zu anderen Spezies ist *E. faecalis* an eine Kolonisation des obturierten Wurzelkanals besonders gut angepasst. Eine Reihe verschiedener Virulenzfaktoren, wie die Fähigkeit zur Produktion von spezifischen Proteasen und die Expression von oberflächlichen Adhäsinen, ermöglichen es der Spezies sich an das Dentin zu binden und auch in die Dentintubuli zu penetrieren (Love 2001, Fisher und Phillips 2009).

Zudem ist *E. faecalis* relativ unempfindlich gegenüber herkömmlichen intrakanalären Desinfektionsmitteln und kann daher im Rahmen der Kanaldesinfektion häufig nicht ausreichend supprimiert werden.

Nachweislich überlebt *E. faecalis* auch medikamentöse Zwischeneinlagen mit Kalziumhydroxid sowie die Applikation von Clindamycin, Tetracyclin, Erythromycin und Iod-Kaliumiodid (Portenier et al. 2004, George und Ivancaková 2007).

Wie eine Studie von Estrela et al. zeigte, konnte *E. faecalis* auch durch die Spülung des Wurzelkanals mit 2,5 % Natriumhypochlorit für 20 min, 2 % Chlorhexidin und ozonisiertem Wasser sowie durch Ozonbegasung nicht wirkungsvoll supprimiert werden (Estrela et al. 2007). Neuartige antiseptische Behandlungsmethoden wie die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) könnten dazu beitragen, die Desinfektion des Wurzelkanalsystems und speziell die Suppressionsmöglichkeit von *E. faecalis* nachhaltig zu verbessern.

## **2.3 Die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT)**

Die photodynamische Wirkung wurde erstmals vor mehr als 100 Jahren von Oskar Raab und Hermann von Tappeiner beschrieben. Raab entdeckte damals zufällig, dass eine wässrige Akridinlösung in Verbindung mit Licht einen toxischen Effekt auf Paramezien aufweist. Kurze Zeit später wurde die neuartige Methode bereits zur Therapie von verschiedenen Hauterkrankungen eingesetzt. Jedoch dauerte es noch bis 1978, bevor die Studien von Dougherty et al. die Grundlagen für die moderne photodynamische Therapie

onkologischer Erkrankungen legten (Dougherty et al. 1978, Dougherty et al. 1979, Kick et al. 1996). Durch die rasante Zunahme multiresistenter Mikroorganismen gewann die photodynamische Therapie auch zur Behandlung von Infektionserkrankungen schnell an Bedeutung (Maisch 2009). Derzeit sind eine Vielzahl von photosensiblen Substanzen mit antimikrobieller Wirkung bekannt. Zudem konnte bisher keine Resistenzentwicklung der verschiedenen Mikroorganismen gegen den photodynamischen Wirkmechanismus nachgewiesen werden (Tavares et al. 2010, Costa et al. 2011, Sharma et al. 2011).

### **2.3.1 Wirkungsweise**

Die antiinfektiöse Wirkung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT) beruht auf dem Zusammenspiel zwischen Photosensitizer (PS), sichtbarem Licht und Sauerstoff (Luksiene 2003). Durch die Absorption eines Lichtquants mit entsprechender Energie wird der PS von seinem Grundstadium in den energetisch höher liegenden Singulett-Zustand überführt und konvertiert von dort umgehend in den angeregten Triplett-Zustand. Ausgehend von diesem Stadium kann es zwischen dem PS und umliegenden Makromolekülen zur Übertragung von Elektronen kommen, was die Entstehung von anionischen und kationischen Radikalen zur Folge hat (Hamblin und Mroz 2008). Diese reagieren dann direkt mit weiteren Zellbestandteilen oder bilden bei Anwesenheit von Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (Typ-I-Reaktion). Wird die Energie von dem angeregten PS jedoch direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen, kommt es zur Entstehung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff (Typ-II-Reaktion). Dabei handelt es sich um ein besonders starkes Oxidationsmittel welches vorwiegend mit ungesättigten Fettsäuren, Proteinen und den Nukleinbasen reagiert (Ochsner 1997, Calzavara-Pinton et al. 2007, Hamblin und Mroz 2008, Plaetzer et al. 2009). Singulett-Sauerstoff und die reaktiven Sauerstoffspezies können durch ihre oxidative Wirkung an der Zellwand und den übrigen Zellbestandteilen irreversible Schäden verursachen, die anschließend zum Absterben des Mikroorganismus führen (Soukos und Goodson 2011).

### **2.3.2 Orale Anwendung der aPDT**

Wie verschiedene Untersuchungen bereits zeigen konnten, ist die aPDT alleine oder in Kombination mit anderen Behandlungsstrategien gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen effizient wirksam. In der zahnmedizinischen Praxis findet die aPDT inzwischen vor allem zur Therapie der Parodontitis, Periimplantitis und zur Desinfektion

von infizierten Wurzelkanälen ihre Anwendung (Konopka und Goslinski 2007, de Paula Eduardo et al. 2010, Rajesh et al. 2011, Schär et al. 2012).

Die antiinfektiöse Wirkung auf verschiedene parodontalpathogene Bakterienspezies konnte von der Jenaer Arbeitsgruppe um Sigusch nachgewiesen werden (Pfitzner et al. 2004, Sigusch et al. 2005, Sigusch et al. 2010). Wie die Ergebnisse einer In-vivo-Tierversuchsstudie zeigen, führt die photodynamische Behandlung zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen Entzündungszeichen. Außerdem konnte auch eine effiziente bakterielle Suppression von *P. gingivals* nachgewiesen werden (Sigusch et al. 2005).

Auch die Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit verschiedenen Photosensibilisatoren auf der Basis von Chlorin und Ruthenium erwiesen sich nach Lichtapplikation ebenfalls als geeignete Farbstoffe für eine mögliche Anwendung im Rahmen der aPDT (Pfitzner et al. 2004, Papastamou et al. 2011).

In einer aktuellen In-vivo-Studie konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der aPDT bei Patienten mit lokalisierter chronischer Parodontitis nachweisbar ist. Die Anwendung der aPDT führte zu einer signifikanten Reduktion der klinischen Entzündungszeichen und hatte eine effiziente Suppression von *Fusobacterium nucleatum* zur Folge (Sigusch et al. 2010).

Für die endodontische Anwendung wird das zur Anregung benötigte Licht über spezielle Applikatoren in das Kanalsystem geleitet. Wie verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, ist so eine effiziente intrakanaläre Desinfektion möglich (Fimple et al. 2008, Ng et al. 2011).

Zudem wurde schon mehrfach versucht, auch die endodontopathogene Spezies *E. faecalis* mittels aPDT zu supprimieren. Jedoch besteht hierbei noch deutlicher Optimierungsbedarf (Fonseca et al. 2008, Rios et al. 2011, Nunes et al. 2011). Durch die Anwendung des Photosensibilisators Methylenblau konnten Foschi et al. nach Applikation von Laserlicht der Wellenlänge 665 nm eine bakterielle Reduktion von 77,5 % erreichen (Foschi et al. 2007). Soukos et al. waren in der Lage, mit dem identischen PS ebenfalls eine signifikante Suppression von *E. faecalis* zu erzielen (Soukos et al. 2006).

Durch die Verwendung von liposomalen Trägersystemen oder durch ein gezieltes Anbinden der PS an diverse Nanopartikel wird derzeit versucht, die Wirkung der aPDT weiter zu steigern (Perni et al. 2011).

Wie Tsai et al. zeigten, konnte durch die Kopplung von Hematoporphyrin an Liposomen und Mizellen eine Aggregation des PS in wässrigem Medium vermieden werden, wodurch die antibakterielle Wirkung signifikant zunahm (Tsai et al. 2009). Die kovalente Bindung herkömmlicher PS an Silikate, Polystyrene sowie an Gold- und Karbonnanopar-

tikel stellen weitere Ansätze dar, um die Eigenschaften der Photosensitizer nachhaltig zu verbessern (Guo et al. 2010, Bezman et al. 1978, Gil-Tomas et al. 2007, Banerjee et al. 2010).

### 2.3.3 Der Photosensitizer mTHPC

Bei dem Farbstoff 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) handelt es sich um einen potenten Photosensitizer der zweiten Generation. Dieser Photosensibilisator weist ein Molekulargewicht von 680,76 Da auf und liegt als Feststoff in Form eines bräunlichen Pulvers vor. Aufgrund des hydrophoben Charakters löst sich mTHPC besonders gut in polaren Lösungsmitteln wie Alkohol, Aceton und Ethylacetat.

Um mTHPC aktivieren zu können, muss dem Farbstoff Licht einer spezifischen Wellenlänge zugeführt werden. Besonders hohe Absorptionsmaxima weist das Molekül bei 415 und 652 nm auf (Bonnett et al. 1989, Ma et al. 1994). Aufgrund der höheren Gewebepenetration kommt klinisch jedoch vorwiegend rotes Licht der Wellenlänge 652 nm zur Anwendung.

Seit 2001 ist der PS unter dem Handelsnamen Foscan<sup>®</sup> für die palliative photodynamische Therapie nichtmelatomatöser Tumore im Kopf- und Halsbereich zugelassen. Weitere Anwendungsgebiete in der onkologischen Therapie, die zur Zeit noch intensiv untersucht werden, könnten zukünftig im gynäkologischen, urologischen und gastrointestinalen Bereich liegen (Senge und Brandt 2011).

Um das pharmakokinetische Profil sowie die photodynamische Wirkung nachhaltig zu verbessern, wurden bisher zahlreiche neuartige mTHPC-Formulierungen hergestellt. Besonders vielversprechend gilt hierbei die Anreicherung des Farbstoffs in Liposomen (Kunt-sche et al. 2010, Dragicevic-Curic et al. 2010, Chen et al. 2011, van Hoogevest et al. 2011). Diese werden beispielsweise unter den Handelsnamen Fospeg<sup>®</sup> und Foslipos<sup>®</sup> geführt. Die neuartigen liposomalen Formulierungen führen nachweislich zu einer signifikant verbesserten Bioverfügbarkeit, Verteilung und Tumorselektivität (Buchholz et al. 2005). Zudem ist durch die Anreicherung in den Liposomen auch eine effiziente topische Anwendung des PS ermöglicht worden (Dragicevic-Curic et al. 2009).

Neben der zytotoxischen Wirkung konnte auch eine antibakterielle photodynamische Effizienz von mTHPC nachgewiesen werden. Wie eine Studie von Kubin et al. zeigt, kann beispielsweise das Wachstum der grampositiven Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* durch Inkubation mit mTHPC und anschließender Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge erheblich supprimiert werden (Kubin et al. 1999).

Eine Steigerung der photodynamischen antibakteriellen Wirkung auf *S. aureus* wurde

durch Anreicherung des Farbstoffs in kationischen Liposomen erreicht. Im Vergleich zu ungebundenen mTHPC war mit der liposomalen Variante eine signifikant höhere Reduktion der Bakterienspezies nachweisbar (Bombelli et al. 2008).

Eine besonders effiziente photodynamische Wirkung auf die grampositiven oralen Bakterienspezies *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus* konnte mit dem liposomalen mTHPC Derivat Foslipos erzielt werden (Lüthi et al. 2009). Die Wirkung der aPDT mittels mTHPC auf *E. faecalis* wurde bisher noch nicht untersucht.



### 3 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der endodontischen Behandlung gilt die grampositive Bakterienspezies *Enterococcus faecalis* als schwer suppressierbar. Neue antiseptische Methoden wie die antimikrobielle Photodynamische Therapie können dazu beitragen, die Desinfektion des Kanalsystems zu verbessern. Wie die aktuelle Literatur zeigt, besteht allerdings hinsichtlich der photodynamischen endodontischen Eradikation dieser Bakterienspezies noch Optimierungsbedarf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob *Enterococcus faecalis* mit der liposomalen mTHPC-Formulierung Foslipos photodynamisch effizient supprimiert werden kann. Folgende Zielstellungen wurden formuliert:

- (1) Ermittlung der antimikrobiellen Wirkung der liposomalen Photosensitizer-Formulierung Foslipos nach Applikation von rotem Laserlicht (652 nm)
- (2) Bestimmung der wirkungsvollsten mTHPC-Konzentration sowie der Lichtenergiedichte des Laserlichts
- (3) Bestimmung der Dunkeltoxizität des Photosensitizers
- (4) Ermittlung des thermischen Einflusses der Laserstrahlung auf die Wachstumsrate der Bakterien
- (5) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Integrität der bakteriellen Zellwand nach der photodynamischen Behandlung

#### **4 Photodynamic suppression of Enterococcus faecalis using the photosensitizer mTHPC, Kranz S, Guellmar A, Völpe A, Gitter B, Albrecht V, Sigusch B, Lasers in Surgery and Medicine, 43, 241-248, 2011**

Nachfolgend ist die Publikation mit dem Titel: „Photodynamic Suppression of Enterococcus faecalis Using the Photosensitizer mTHPC“ in der Originalfassung aufgeführt. Das Dokument umfasst 8 Seiten, 5 Abbildungen und 63 Literaturstellen. Das Manuskript wurde am 11.02.2011 von dem Journal „Lasers in Surgery and Medicine“ akzeptiert und am 15.03.2011 in der Wiley Online Library publiziert. Der Abdruck erfolgte in der 3. Auflage der 43. Ausgabe des Journals im März 2011 auf den Seiten 241 bis 248. Die DOI-Kennnummer lautet: 10.1002/lsm.21046. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wurde die Fachzeitschrift mit einem Impact-Faktor von 3,0 beziffert.

# Photodynamic Suppression of *Enterococcus faecalis* Using the Photosensitizer mTHPC

Stefan Kranz,<sup>1\*</sup> Andre Guellmar, Dr,<sup>1</sup> Andrea Völpel, Dipl-Ing,<sup>1</sup> Burkhard Gitter, Dr,<sup>2</sup> Volker Albrecht, Prof,<sup>2</sup> and Bernd W. Sigusch, PD Dr<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Conservative Dentistry, Friedrich Schiller University, Jena, Germany

<sup>2</sup>Biolitec AG, Jena, Germany

**Background and Objectives:** *Enterococcus faecalis* is frequently found in persistent endodontic infections. In this context, the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) could become a modern alternative to existing antibacterial treatment approaches. The aim of this study was to investigate the effect of aPDT on *E. faecalis* using the photosensitizer (PS) 5,10,15,20-tetra(*m*-hydroxyphenyl)-chlorin (mTHPC) enriched in liposomes.

**Materials and Methods:** *Enterococcus faecalis* was cultivated in Schaedler submerged culture for 24 hours, then isolated and adjusted in PBS to  $10^8$  cells/ml. The bacterial suspension was pipetted into a black microtitration plate and incubated for 15 minutes in the dark with mTHPC in various concentrations (10, 30, and 50  $\mu$ M). The photosensitized suspensions were subjected to laser light (652 nm) at a light fluence of 100 J cm<sup>-2</sup> (test group A). In addition, the suspension sensitized with 50  $\mu$ M mTHPC was irradiated with 25, 50, and 75 J cm<sup>-2</sup> (test group B). The following controls were used: non-irradiated bacterial suspension in the absence of mTHPC (C); irradiated bacterial suspension in the absence of mTHPC (D); non-irradiated bacterial suspension incubated with mTHPC (E). Dilution series ( $10^0$ – $10^{-6}$ ) were made of all groups and applied on Schaedler agar. After anaerobic cultivation (4 days), the colony-forming units (CFU/ml) were determined.

**Results:** *Enterococcus faecalis* was suppressed completely after incubation with 50  $\mu$ M mTHPC and illumination with 100 J cm<sup>-2</sup>. Photodynamic treatment with 10 and 30  $\mu$ M mTHPC caused reduction in CFU by 5.8 and 6.7 log-units. The application of an energy fluence <100 J cm<sup>-2</sup> resulted in a decline of antibacterial efficiency. Irradiation of the non-photosensitized solution showed no suppressing impact. Incubation of the PS without additional irradiation caused a maximal reduction in CFU by 1.5 log-units.

**Conclusion:** The results show that aPDT using the PS mTHPC incorporated in liposomes could be a new approach to adjuvant treatment of endodontic infections with *E. faecalis*. Lasers Surg. Med. 43:241–248, 2011.

© 2011 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** aPDT; carrier system; endodontic pathogen; Foslipos; laser; liposome; persistent infection; photodynamic therapy

## INTRODUCTION

The antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is considered to be a promising innovative method for treating

infections of dental hard and soft tissues [1–5]. In particular, the antimicrobial effect of this method is based on the cytotoxic potential of singlet oxygen and other free radicals formed by irradiation of a photosensitizing agent, also called photosensitizer (PS), with light of an appropriate wavelength. By using aPDT, our study group has demonstrated so far that various periodontally pathogenic bacterial species can be suppressed successfully, both in vitro and in vivo [6–8]. Especially the results of a recently published in vivo study show that aPDT not only suppresses pathogenic species but also markedly improves the clinical parameters of localized chronic periodontitis [9]. Because of the mode of action described, the method can lead to a sufficient inhibition of various species that show resistance to conventional therapeutic treatment procedures [10,11]. In particular, endodontic infections with the Gram-positive bacterial species *Enterococcus faecalis* are frequently seen as a therapeutic problem in dental cure [12,13]. This species, which is often detected in refractory endodontic lesions, shows a natural resistance to the common disinfectants Ca(OH)<sub>2</sub>, EDTA as well as to iodine-containing tinctures [14–16]. While sodium hypochloride and chlorhexidine, the most frequently studied and employed antimicrobial agents for root canal disinfection, show reliable suppression of the species in vitro, they sometimes fail to achieve sufficient elimination in vivo [17–21]. It is also well known that various strains of *E. faecalis* possess an acquired antibiotic resistance to metronidazole, clindamycin, and vancomycin [22,23]. Regarding this, application of aPDT could be an alternative therapeutic treatment method to successfully suppress *E. faecalis*. Several study groups have already tried to inhibit the species in infected root canals, although with limited success so far [24–26]. Present efforts to develop novel strategies are expected to contribute to a lasting improvement in the antibacterial efficiency of aPDT. In

*Disclosure of proprietary interest:* I certify that I have no affiliation with or financial involvement in any organization or entity with a direct financial interest in the subject matter or materials discussed in the manuscript (e.g., employment, consultancies, stock ownership, honoraria) except as discussed in an attachment.

\*Corresponding to: Stefan Kranz, Department of Conservative Dentistry, Friedrich Schiller University, An der alten Post 4 Jena, 07743, Germany. E-mail: stefan.kranz@med.uni-jena.de

Accepted 10 January 2011

Published online 15 March 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/lsm.21046

particular, researchers attempt, by bonding the photosensitizing agent to special carrier systems, to improve transportation and interaction with the bacterial cell [27–29]. One promising option describes the linking of the PS to various amphiphilic derivatives. In a recently published study, for example, it was proven that the antibacterial efficiency of methylene blue and neutral red could be significantly increased by their enrichment in liposomes [30]. Furthermore, it was described that the charged liposomes possibly have a destabilizing influence on the bacterial cell membrane, which goes along with an enhanced cellular uptake of PS [31]. Recently, Ferro et al. [32] also reported a significantly boosted antibacterial effect as well as an increased endocellular enrichment of PS after incubation of the bacteria with liposomally bound sensitizer.

In the present study, the commercially available hydrophobic photosensitizing compound 5,10,15,20-tetra(*m*-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) was used. This PS is considered to be one of the most potent photosensitizing agents and is already in use for photodynamic treatment of non-melanomatous skin tumors of the head and neck [33,34]. Recently, it was also shown that *Staphylococcus aureus* can be suppressed sufficiently by means of aPDT using mTHPC [35]. The objective of the present in vitro study was to investigate the efficacy of aPDT using mTHPC enriched in liposomes with regard to the endodontopathogenic species *E. faecalis*.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Species

In the present in vitro study, we investigated the effect of aPDT on the facultatively anaerobic, Gram-positive bacterium *E. faecalis* (DSMZ 20376). Cell reproduction was effected in 10 ml of Schaedler culture medium (Oxoid Ltd, Hampshire, UK) under standard anaerobic conditions for 24 hours. The bacteria were pelleted (4,000 rpm, 8 minutes) and washed twice with PBS. The bacterial pellet was then resuspended with PBS and the optical density ( $OD_{546\text{ nm}}$ ) set to a level of 0.3 (about  $10^8$  cells/ml).

### Photosensitizer

For the photodynamic suppression of *E. faecalis* the liposomal mTHPC formulation Foslipos (Biolitec AG, Jena, Germany) was used. This is a colloidal solution of uncharged liposomes where the lipophilic PS mTHPC is enriched in the double membrane layer. The liposomes used consisted of 18 mg/ml dipalmitoyl-phosphatidylcholine and 2 mg/ml dipalmitoyl-phosphatidylglycerol. Stock solutions were made to establish final PS concentrations of 10, 30, and 50  $\mu\text{M}$  in the bacterial suspension.

### Light Application System

The mTHPC was activated by red laser light of wavelength  $652 \pm 4$  nm. We used a GaAs diode laser (Ceralas PDT, Biolitec AG) with a maximum output power of  $2\text{ W} \pm 10\%$ . The light guide was a Medlight FD1 flexible optical fiber with a frontal stray light distributor (Medlight SA Ecublens, Switzerland). The core diameter of the fiber

was 600  $\mu\text{m}$ , with a light transmission of  $>80\%$  and a divergence angle of  $34.7^\circ$ . Photodynamic treatment of the sensitized bacterial suspension was carried out in a black 96-well microtitration plate. For irradiation, the plate was placed on a PC-controlled laser scanning stage (Maerzhaeuser, Wetzlar, Germany) with a distance of 10 mm between the fiber aperture and the plate bottom. This permitted complete illumination of the respective well. Light application was done with a constant laser output of 1 W. The various light energy densities of 25, 50, 75, and 100  $\text{J cm}^{-2}$  were achieved by differing irradiation times.

### Thermometry

During light application (0–100  $\text{J cm}^{-2}$ ), the temperature variation in the bacterial suspension, both with and without PS (50  $\mu\text{M}$ ), was recorded. Measurement was made by means of a *k*-type thermocouple and the PICO TC08 data logger (PICO Technology Ltd, Cambridge, UK). For displaying the recorded data we used the PicoLog Software Development Kit (PICO Technology Ltd). After five repetitions of the experiment, a statistical analysis of the mean values was performed.

### Antibacterial Photodynamic Therapy (aPDT)

The investigation was conducted in five groups (A–E, Table 1). In test group (A), we tested the photodynamic antibacterial effect of different PS concentrations (10, 30, and 50  $\mu\text{M}$ ). For this purpose, the bacterial suspension was incubated for 15 minutes with the test concentration and subsequently irradiated with 100  $\text{J cm}^{-2}$ . In test group (B), the influence of different energy densities on the efficiency of aPDT was determined. For this purpose, the bacterial suspension was subjected to dark incubation for 15 minutes with 50  $\mu\text{M}$  mTHPC each and subsequently irradiated with 25, 50, and 75  $\text{J cm}^{-2}$ , respectively.

Control groups were the untreated bacterial suspension (C), the bacterial suspension irradiated with laser light alone (100  $\text{J cm}^{-2}$ ) (D), and the non-irradiated bacterial suspension incubated with 10, 30, and 50  $\mu\text{M}$  PS for 15 minutes (dark toxicity) (E).

Ten samples were investigated per group. The experiment was performed in black 96-well microtitration plates, in which 190  $\mu\text{l}$  of bacterial suspension was mixed with 10  $\mu\text{l}$  PS stock solution of the respective concentration. After the experiment, dilution series ( $10^{-1}$ – $10^{-6}$ ) from all test batches were made using PBS, and 100  $\mu\text{l}$  of each dilution was applied to sterile Schaedler agar (Oxoid Ltd). After cultivation for 4 days under standard anaerobic conditions, the number of colony-forming units (CFU/ml) was determined.

### Fluorescence Microscopy

After aPDT using liposomal mTHPC, the functional integrity of the bacterial cell membrane was examined by fluorescence microscopy. To distinguish between bacteria with damaged and undamaged cell membrane, the Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> vitality assay (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used.

**TABLE 1. Overview of the Experimental Group Setup**

Group	Modality
A	Bacterial solution + mTHPC $\left\{ \begin{array}{l} 10 \mu\text{M} \\ 20 \mu\text{M} \\ 30 \mu\text{M} \end{array} \right\} + \text{light } 100 \text{ J cm}^{-2}$
B	Bacterial solution + mTHPC $50 \mu\text{M} + \text{light } \left\{ \begin{array}{l} 25 \text{ J cm}^{-2} \\ 50 \text{ J cm}^{-2} \\ 75 \text{ J cm}^{-2} \end{array} \right\}$
C	Bacterial solution
D	Bacterial solution + light $100 \text{ J cm}^{-2}$
E	Bacterial solution + mTHPC $\left\{ \begin{array}{l} 10 \mu\text{M} \\ 30 \mu\text{M} \\ 50 \mu\text{M} \end{array} \right\}$

Five samples of each of the groups A, C, D, and E were collected in separate Eppendorf tubes and the cells pelleted by centrifugation (4,000 rpm, 8 minutes). The bacterial pellet was resuspended in PBS (100  $\mu\text{l}$ ). The suspension was then treated with the BacLight vitality test according to the manufacturer's instructions. After incubation of 15 minutes, the samples were examined with a fluorescence microscope (Labophot-2, Nikon, Japan) using a Fluor 100/1,30 Oil Ph 4 DL objective (Nikon, Kanagawa, Japan) and a digital camera (Digital Sight-DS 2 Mv; Nikon).

### Statistical Analysis

The results of the cell count of *E. faecalis* were statistically analyzed with the PC program SPSS 17.0. Significant differences between the groups were ascertained with the non-parametric Mann-Whitney *U*-test. The significance level was  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Antibacterial Photodynamic Therapy (aPDT)

In the present in vitro study, the effect of aPDT on the Gram-positive bacterial species *E. faecalis* was investigated. In particular, we determined the antibacterial efficiency of a novel liposomal mTHPC formulation as a function of the PS concentration used and the light energy density supplied. As the results show *E. faecalis* can be suppressed completely ( $P < 0.05$ ) by means of aPDT after incubation with  $50 \mu\text{M}$  mTHPC (15 minutes) and irradiation with a light fluence of  $100 \text{ J cm}^{-2}$  (Fig. 1). However, a reduction in PS concentration as well as energy density significantly reduces the antibacterial effect of the treatment (Figs. 1 and 2). In particular, incubation with 10 and  $30 \mu\text{M}$  mTHPC, each following irradiation with an energy density of  $100 \text{ J cm}^{-2}$  still causes a significant inhibition by 5.8 and 6.7 log-units (Fig. 1). As already mentioned, the application of energy fluence rates lower  $100 \text{ J cm}^{-2}$  also result in a decrease of the antibacterial effect. Nevertheless, incubation with  $50 \mu\text{M}$  mTHPC following irradiation with light fluence rates of 50 and  $75 \text{ J cm}^{-2}$  still reduces bacterial growth by 6.3 and 7 log-units, respectively ( $P < 0.05$ ).

The application of only  $25 \text{ J cm}^{-2}$  still leads to a suppression of *E. faecalis* by 6 log-units (Fig. 2).

To exclude a direct influence of the laser light on the vitality of the bacteria, cell growth was determined after irradiation of non-sensitized cells with  $100 \text{ J cm}^{-2}$ . As the results show laser irradiation alone compared to the untreated control group has no significant influence ( $P > 0.05$ ) on the bacterial growth rate (Fig. 3). In addition, the toxicity of the liposomal mTHPC formulation was checked after an exposure time of 15 minutes. Dark incubation of the bacteria with increasing mTHPC concentrations ( $10$ – $50 \mu\text{M}$ ) caused a minor suppression ( $P < 0.05$ ) by 1.4–1.5 log-steps (Fig. 3).

### Thermometry

Because of the energy transmission during light application, the temperature of bacterial suspension increased. After a delivery of  $100 \text{ J cm}^{-2}$ , the temperature increased by approx.  $6^\circ\text{C}$ . No caloric difference was found, though between the suspensions without and with PS (Fig. 4). However, determining the cell counts (Fig. 3) after irradiation proved that the induced thermal heat has no growth-inhibiting influence on *E. faecalis*.

### Fluorescence Microscopy

The use of the BacLight vitality test permitted us to make a qualitative distinction between functionally intact bacteria and such with impaired cell membrane. Figure 5a shows the fluorescence of the untreated bacterial suspension. The majority of the bacterial cells exhibit green fluorescence, which indicates that the barrier function of the cell membrane is intact. After irradiation of the non-photosensitized bacterial solution with  $100 \text{ J cm}^{-2}$ , as well as after incubation of the micro-organisms with liposomal mTHPC (15 minutes) without subsequent irradiation, the functional integrity of the membranes of the majority of all cells was also found intact (Fig. 5b,c<sub>1</sub>–c<sub>3</sub>). In contrast to this, aPDT treatment, irrespective of the PS concentration used, markedly damaged the bacteria in the test batch (Fig. 5d<sub>1</sub>–d<sub>3</sub>). Application of aPDT abolishes the barrier

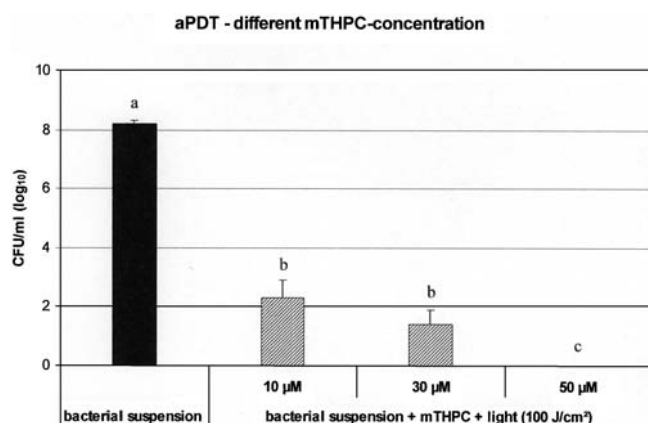


Fig. 1. Reduction in colony-forming units (CFU) after anti-bacterial photodynamic treatment with 10, 30, and 50  $\mu\text{M}$  mTHPC incubated for 15 minutes (logarithmic plot). Illumination was performed with a light fluence of  $100 \text{ J cm}^{-2}$  each. The data represent the mean of 10 independent experiments  $\pm$  SD. Values not sharing a common superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

function of the cell membrane to propidium iodide, which is indicated by red fluorescence of the cells.

## DISCUSSION

*Enterococcus faecalis* is a particularly resistant endodontopathogenic bacterial species. Treatment with conventional disinfectants leads only to a partial reduction of this species [20,36]. Various other treatment strategies also fail to achieve complete suppression [37–39]. As the results of the present study show *E. faecalis* can be completely suppressed with the liposomal mTHPC sensitizer (Foslipos) and

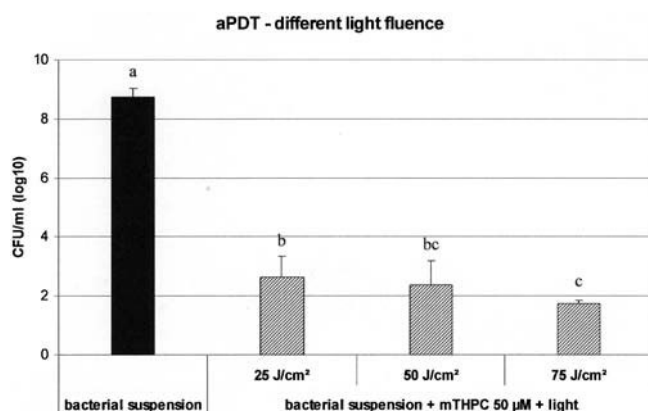


Fig. 2. Reduction in colony-forming units (CFU) after anti-bacterial photodynamic treatment with 50  $\mu\text{M}$  mTHPC incubated for 15 minutes (logarithmic plot). Illumination was performed with 25, 50, and 75  $\text{J cm}^{-2}$ . The data represent the mean of 10 independent experiments  $\pm$  SD. Values not sharing a common superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

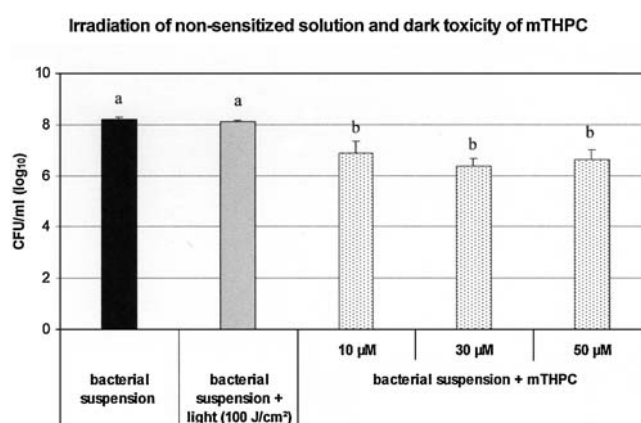


Fig. 3. Influence of laser light ( $100 \text{ J cm}^{-2}$ ) on bacterial cell growth and dark toxic effect of 10, 30 and 50  $\mu\text{M}$  mTHPC after incubation for 15 minutes (logarithmic plot). The data represent the mean of 10 independent experiments  $\pm$  SD. Values not sharing a common superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

appropriate laser energy. This PS is a novel suspension of liposomes in which the hydrophobic PS mTHPC has been enriched. To completely suppress *E. faecalis* with this photodynamically activable formulation, an mTHPC concentration of 50  $\mu\text{M}$  and the application of 652 nm laser light with a fluence rate of  $100 \text{ J cm}^{-2}$  are required. The anti-bacterial effect of aPDT using mTHPC has been observed by other study teams as well. Recently, Lüthi et al. [40] showed that Foslipos can be successfully used to suppress the cariogenic species *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Engelhardt et al. [35] studied the photodynamic efficacy of Fospeg, a similar liposomal mTHPC formulation, against *Staphylococcus aureus*. In their experiments, though the application of red halogen light ( $75 \text{ mW cm}^{-2}$ , 30 minutes) reduced this species by 4–5 log-units only.

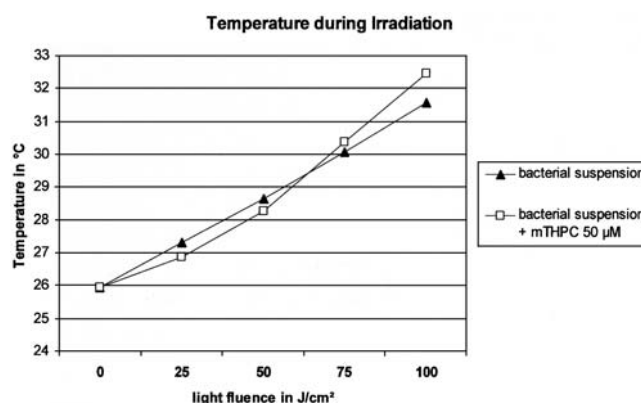


Fig. 4. Rise of temperature during illumination ( $0\text{--}100 \text{ J cm}^{-2}$ ) of the bacterial solution without photosensitizer, and sensitized with 50  $\mu\text{M}$  mTHPC for 15 minutes. The data represent the mean of five independent experiments.

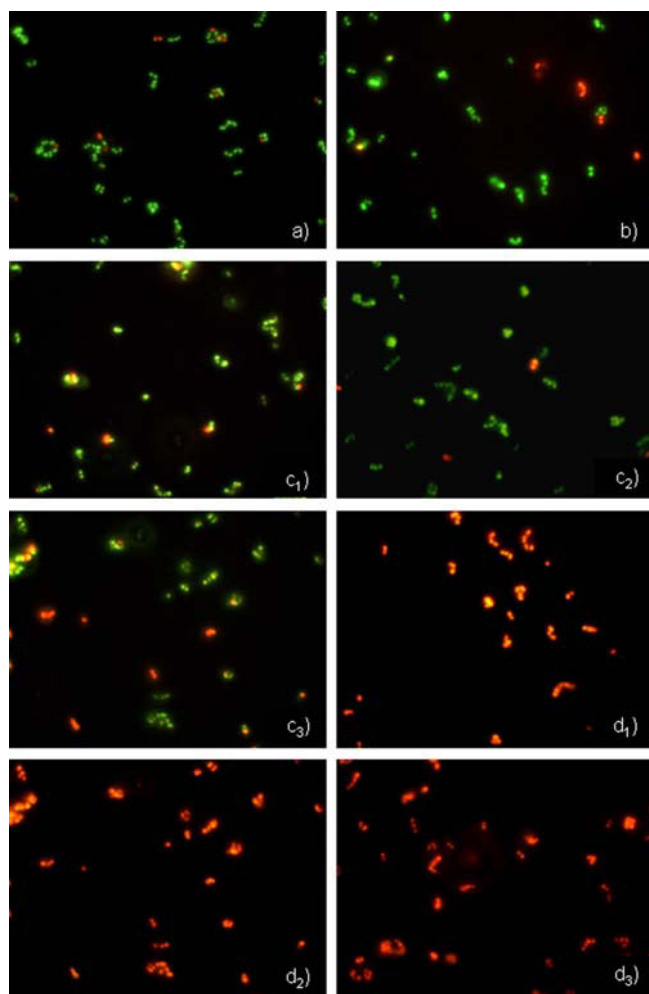


Fig. 5. The pictures show the fluorescence images of the differently treated bacterial cells subjected to the Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> viability assay. Bacterial cells which appear green possess an undamaged cell membrane, whereas bacteria with red fluorescence are characterized by a loss of functional integrity. Pictures were taken by 100× magnification. **a**: Bacterial solution; **b**: bacterial solution + light ( $100 \text{ J cm}^{-2}$ ); **c1**: bacterial solution +  $10 \mu\text{M}$  mTHPC; **c2**: bacterial solution +  $30 \mu\text{M}$  mTHPC; **c3**: bacterial solution +  $50 \mu\text{M}$  mTHPC; **d1**: bacterial solution +  $10 \mu\text{M}$  mTHPC + light  $100 \text{ J cm}^{-2}$ ; **d2**: bacterial solution +  $30 \mu\text{M}$  mTHPC + light  $100 \text{ J cm}^{-2}$ ; **d3**: bacterial solution +  $50 \mu\text{M}$  mTHPC + light  $100 \text{ J cm}^{-2}$ .

Bombelli et al. [41] also used mTHPC enriched in liposomes to suppress *Staphylococcus aureus* photodynamically. To additionally enhance interaction with the negatively charged cell wall, they used liposomes with a positive superficial charge. Subsequent irradiation with mixed light (350–700 nm, 30 minutes) also led to significant bacterial reduction [41].

As the results of the cited studies show long irradiation times and high total energy doses were used to achieve sufficient suppression of the bacterial species [35,40,41].

In contrast to this, in the present study we achieved complete suppression after an irradiation time of just 33 seconds and a total energy density of only  $100 \text{ J cm}^{-2}$ . In contrast to the above-mentioned studies, in the present study red laser light at a wavelength of 652 nm rather than mixed light was used to activate mTHPC. It is true that irradiation with mixed light completely covers the broad absorption spectrum of the PS used (284, 306, 415, 516, 543, 591, and 652 nm), but only light of a greater wavelength is capable of penetrating well into biological material [33,42]. For this reason, long-wave red light is predominantly recommended especially for aPDT of oral plaque bacteria [43].

An absorption maximum similar to that of the mTHPC, likewise in the red spectral region, is found for the phenothiazine-containing dye methylene blue. The aPDT effect of this sensitizer on *E. faecalis* has already been investigated. However, as the results by George and Kishen [44] showed this species can only be insufficiently suppressed using methylene blue. Studies by Soukos et al. [45] on the photodynamic disinfection of infected root canals confirmed that the effect of methylene blue on *E. faecalis* is insufficient unless extremely high energy ( $222 \text{ J cm}^{-2}$ ) is applied. Compared to the poor effect of methylene blue, the results of the present study show that *E. faecalis* can be completely suppressed with mTHPC and an energy density up to  $100 \text{ J cm}^{-2}$ . Already a light fluence of only  $25 \text{ J cm}^{-2}$  causes reduction of the bacteria sensitized with  $50 \mu\text{M}$  mTHPC by up to 6 log-units.

Alves et al. [46] investigated various porphyrins for their photodynamic efficacy against *E. faecalis*. Being compounds akin to mTHPC, the porphyrins caused a maximum bacterial growth inhibition of  $>7$  log-units. Complete suppression of *E. faecalis* as described in the present study has not been achieved so far. It must be considered that though aPDT of dental root canals is facing different environmental conditions compared to those of the experimental setup described in the present study. Even if chemo-mechanical debridement is performed to the highest technical standards, microbes can remain in inaccessible areas of the root canal system. Those might exist there in a biofilm mode. As it is known, microorganisms that are grown as a biofilm are protected to some extent from antimicrobial attacks [47]. Surprisingly, in vitro experiments have shown that aPDT is effective in eradicating planktonic and biofilm cultures to almost the same degree [48–50]. Nevertheless, in order to ensure sufficient antibacterial photodynamic disinfection, it is suggested to use aPDT as adjuvant to conventional endodontic treatment methods [51]. In the present study, a sufficient interaction of the bacteria with PS and a uniform irradiation was likely to occur. As there is shown, light can be delivered easily to the endodontic system by special application tips [24,26,52]. Still it is hard to say if the released light is able to actually reach all sides of the endodontic lesion. Especially the flow of light through the dentin still needs to be observed more precisely.

Up from a certain intensity threshold, light energy may cause thermal cell damage [53]. In the present study, we measured a maximum temperature increase of  $6^\circ\text{C}$  in the bacterial suspension due to delivery of laser light. From the

data obtained, it is obvious that irradiation with  $100 \text{ J cm}^{-2}$  has no substantial influence on bacterial growth and that the complete suppression of *E. faecalis* was due to the PDT action. Dickens et al. [54] studied the temperature variation on the root surface during endodontic aPDT treatment. The delivery of  $106 \text{ J cm}^{-2}$  caused a temperature rise by no more than  $0.16^\circ\text{C}$ . Up to this energy level, endodontic aPDT treatment using a diode laser is classified by the authors as innocuous to the periodontium [54].

In the present study, we proved that the antibacterial efficiency of the aPDT method varies with the PS concentration used and the light energy applied. Reduction of the PS concentration and a decrease in activation energy led to a slightly diminished suppression of *E. faecalis*. The results of other authors confirm that the antibacterial efficacy of aPDT is governed by the type of PS used, its concentration and the quantity of the light energy delivered [55]. This means that in future clinical use of the aPDT method investigated in this study, laser light energy and PS concentration must be optimally matched to achieve the best possible efficiency. Because of the cytotoxicity of some PSs, incubation of the microorganisms with the respective dyes decreases the bacterial count even without light activation [24,44]. In the present study, we established that even dark incubation of *E. faecalis* for 15 minutes with  $50 \mu\text{M}$  mTHPC led to a slight bacterial reduction by up to 1.5 log-units. However, other authors found that intense incubation with methylene blue ( $44 \mu\text{M}$ ) and toluidine blue O ( $6 \mu\text{M}$ ) caused a bacterial reduction by 6.3 or 6.8 log-units, respectively [55].

For endodontic application, the cytotoxic potential of the PS to adjacent human cells is of great interest. In the case of mTHPC, the potential dark toxic effect is examined for several cell types. Depending on PS concentration, dark incubation time, cell line and drug formulation, the dark toxicity of mTHPC is rated to be low [56–59]. Furthermore, it is shown that aPDT is a safe procedure for normal adjacent cells of the apical region. Studies by George and Kishen [60] confirm that the surrounding tissue is significantly less irrigated by photodynamic treatment than by conventional antibacterial disinfectants. As suggested also by Xu et al. [61], there is a safe therapeutic window in which aPDT can inactivate endodontic pathogens without affecting host cell viability.

In the present study, it has been shown that aPDT using liposomal mTHPC causes damage to the bacterial cell wall. As a result of the functional integrity of the cell membrane thus reduced, fluorescence microscopy proved the enrichment of propidium iodide inside the cell. In vitro experiments by Sahu et al. [62] documented that the loss of bacterial membrane stability after aPDT results in a leakage of cytoplasmatic liquid. The strength of the effect depended on the energy density used. As a result of the volume loss after aPDT, the authors also observed an increase in surface roughness, flattening of the cells, and a loss of connection between cell membrane and the cell wall [62,63]. The results of the present study show that aPDT with liposomal mTHPC leads to a massive damage of the cell wall correlating with low viable bacterial cell counts. No destructive influence on the bacterial membrane was

observed after dark incubation of *E. faecalis* with PS and irradiation ( $100 \text{ J cm}^{-2}$ ) without mTHPC application.

## CONCLUSION

The results of the present study show that *E. faecalis* can be completely suppressed by means of aPDT using liposome-incorporated mTHPC. Therefore, incubation with  $50 \mu\text{M}$  liposomal mTHPC for 15 minutes and irradiation of  $100 \text{ J cm}^{-2}$  was necessary ( $P < 0.05$ ). The aPDT method described could be used in future in the clinical disinfection of infected root canals. In supplementary studies, we are about to find out whether the antibacterial effect of the system employed also acts sufficiently on the biofilm established in the root canal system.

## REFERENCES

- O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med* 2002;31(2):86–90.
- Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: Enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med* 2003;33(3):161–168.
- Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 2006;38(5):468–481.
- Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007;86(8):694–707.
- Lim Z, Cheng JL, Lim TW, Teo EG, Wong J, George S, Kishen A. Light activated disinfection: An alternative endodontic disinfection strategy. *Aust Dent J* 2009;54(2):108–114.
- Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75(10):1343–1349.
- Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005;76(7):1100–1105.
- Papastamou V, Nietzsche T, Staudte H, Orellana G, Sigusch BW. Photoinactivation of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* using the ruthenium-based RD3 sensitizer and a conventional halogen lamp. *Arch Oral Biol* 2010. (DOI:10.1016/j.archoralbio.2010.10.007).
- Sigusch BW, Engelbrecht M, Volpel A, Holletschke A, Pfister W, Schutze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol* 2010;81(7):975–981.
- Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: Antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem* 2009;9(8):974–983.
- Tseng SP, Teng LJ, Chen CT, Lo TH, Hung WC, Chen HJ, Hsueh PR, Tsai JC. Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Surg Med* 2009;41(5):391–397.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32(2):93–98.
- Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J* 2009;42(4):277–287.
- Portenier I, Tuomos MT, Haapasalo W, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*—The root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *Endod Top* 2004;6(1):135–159.
- Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, Orstavik D. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *J Endod* 2009;35(1):46–49.
- Lin S, Kfir A, Laviv A, Sela G, Fuss Z. The in vitro antibacterial effect of iodine-potassium iodide and calcium hydroxide in infected dentinal tubules at different time intervals. *J Contemp Dent Pract* 2009;10(2):59–66.



17. Estrela C, Silva JA, de Alencar AH, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*—A systematic review. *J Appl Oral Sci* 2008;16(6):364–368.
18. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod* 2009;35(5):711–714.
19. Giles LH, Chan SN, Jarad F, Hope C. The efficacy of different endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* in an extracted human tooth model. *Int Endod J* 2010;43(4):351–353.
20. Harrison AJ, Chivatzaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J* 2010;43(11):968–977.
21. Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos MA, Mendonca RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Junior M, Magalhaes PP, Santos MH, de Macedo Farias L. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2010;36(5):894–898.
22. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medications in endodontics. *Aust Dent J* 2007;52 (1 Suppl): S64–S82.
23. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009;155 (Pt 6): 1749–1757.
24. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, Pagonis TC, Kent R, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 2007;39(10):782–787.
25. Fonseca MB, Junior PO, Pallota RC, Filho HF, Denardin OV, Rapoport A, Dedivitis RA, Veronezi JF, Genovese WJ, Ricardo AL. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg* 2008;26(3):209–213.
26. Meire MA, De Priick K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJ. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J* 2009;42(4):351–359.
27. Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2002;66(2):89–106.
28. Schwierz J, Wiehe A, Grafe S, Gitter B, Eppler M. Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. *Biomaterials* 2009;30(19): 3324–3331.
29. Guo Y, Rogelj S, Zhang P. Rose Bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of Gram-positive bacteria. *Nanotechnology* 2010;21(6):065102.
30. Nisnevitch M, Nakonechny F, Nitzan Y. Photodynamic antimicrobial chemotherapy by liposome-encapsulated water-soluble photosensitizers. *Bioorg Khim* 2010;36(3):396–402.
31. Tsai T, Yang YT, Wang TH, Chien HF, Chen CT. Improved photodynamic inactivation of Gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. *Lasers Surg Med* 2009;41(4):316–322.
32. Ferro S, Ricchelli F, Mancini G, Tognon G, Jori G. Inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by liposome-delivered photosensitising agents. *J Photochem Photobiol B* 2006;83(2):98–104.
33. Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydrophobicity of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J* 1989;261(1):277–280.
34. Kubler AC, Haase T, Staff C, Kahle B, Rheinwald M, Muhling J. Photodynamic therapy of primary nonmelanomatous skin tumours of the head and neck. *Lasers Surg Med* 1999;25(1): 60–68.
35. Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9(3):365–369.
36. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010; 36(1):70–77.
37. Kustarci A, Sumer Z, Altunbas D, Kosum S. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: An ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107(5):e73–e79.
38. Pirnat S, Lukac M, Ihan A. Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria. *Lasers Med Sci* 2010. (DOI: 10.1007/s10103-010-0808-7).
39. Yavari HR, Rahimi S, Shahi S, Lotfi M, Barhaghi MH, Fatemi A, Abdolrahimi M. Effect of Er, Cr: YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Photomed Laser Surg* 2010;28 (Suppl 1): S91–S96.
40. Lüthi M, Gyenge EB, Engström M, Bredell M, Grätz K, Walt H, Gmür R, Maake C. Hypericin- and mTHPC-mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Med Laser Appl* 2009;24(4):227–236.
41. Bombelli C, Bordini F, Ferro S, Giansanti L, Jori G, Mancini G, Mazzuca C, Monti D, Ricchelli F, Sennato S, Venanzi M. New cationic liposomes as vehicles of m-tetrahydroxyphenylchlorin in photodynamic therapy of infectious diseases. *Mol Pharm* 2008;5(4):672–679.
42. Ma L, Moan J, Berg K. Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: A comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. *Int J Cancer* 1994;57(6): 883–888.
43. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3(5):412–418.
44. George S, Kishen A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem Photobiol* 2008;84(3):734–740.
45. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006;32(10):979–984.
46. Alves E, Costa L, Carvalho CM, Tome JP, Faustino MA, Neves MG, Tome AC, Cavaleiro JA, Cunha A, Almeida A. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol* 2009;9:70.
47. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):999–1007.
48. Street CN, Gibbs A, Pedigo L, Andersen D, Loebel NG. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture. *Photochem Photobiol* 2009; 85(1):137–143.
49. Goulart Rde C, Thedei G, Jr., Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010;28 (Suppl 1):S85–S90.
50. Street CN, Pedigo LA, Loebel NG. Energy dose parameters affect antimicrobial photodynamic therapy-mediated eradication of periopathogenic biofilm and planktonic cultures. *Photomed Laser Surg* 2010;28 (Suppl 1): S61–S66.
51. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007;39(1):59–66.
52. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008;34(6):728–734.
53. Hellingwerf KJ, Hoff WD, Crielard W. Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signalling. *Mol Microbiol* 1996;21(4):683–693.
54. Dickers B, Lamard L, Peremans A, Geerts S, Lamy M, Limme M, Rompen E, De Moor RJ, Mahler P, Rocca JP, Nammour S. Temperature rise during photo-activated disinfection of root canals. *Lasers Med Sci* 2009;24(1):81–85.
55. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29(2):165–173.
56. Hornung R, Jentsch B, Crompton NE, Haller U, Walt H. In vitro effects and localisation of the photosensitizers m-THPC and m-THPCMD on carcinoma cells of the human breast (MCF-7) and Chinese hamster fibroblasts (V-79). *Lasers Surg Med* 1997; 20(4):443–450.

57. Hofman JW, Carstens MG, van Zeeland F, Helwig C, Flesch FM, Hennink WE, van Nostrum CF. Photocytotoxicity of mTHPC (temoporfin) loaded polymeric micelles mediated by lipase catalyzed degradation. *Pharm Res* 2008;25(9):2065–2073.
58. Wright KE, Liniker E, Loizidou M, Moore C, MacRobert AJ, Phillips JB. Peripheral neural cell sensitivity to mTHPC-mediated photodynamic therapy in a 3D in vitro model. *Br J Cancer* 2009;101(4):658–665.
59. Berlanda J, Kiesslich T, Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *J Photochem Photobiol B* 2010;100(3):173–180.
60. George S, Kishen A. Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33(5):599–602.
61. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, Kent R, Soukos NS. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: Safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod* 2009;35(11):1567–1572.
62. Sahu K, Bansal H, Mukherjee C, Sharma M, Gupta PK. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of toluidine blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B* 2009; 96(1):9–16.
63. Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(3): 895–902.

## 5 Diskussion

Die grampositive Bakterienspezies *Enterococcus faecalis* gilt im Rahmen der endodontischen Therapiemaßnahmen als besonders widerstandsfähig und lässt sich mit den herkömmlichen intrakanalären Desinfektionsmaßnahmen häufig nicht ausreichend supprimieren. Wie verschiedene Studien bisher zeigen konnten, ist diese Spezies gegenüber den bakteriziden Einflüssen von Natriumhypochlorid, Chlorhexidin und Kalziumhydroxid relativ unempfindlich. Selbst nach intensiver antiseptischer Ultraschallspülung ist die Bakterienspezies zum Teil noch in hoher Anzahl im Kanalsystem nachweisbar (Harrison et al. 2010, Dornelles-Morgental et al. 2011, Mohammadi und Dummer 2011).

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, ist eine vollständige photodynamische Suppression dieser Bakterienspezies mit der liposomalen mTHPC-Formulierung Foslipos möglich. Hierfür war eine PS-Konzentration von  $50\text{ }\mu\text{M}$  mTHPC und eine Lichtenergie von  $100\text{ J/cm}^2$  (652 nm) notwendig.

Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen diskutieren, dass mittels aPDT die Beeinflussung von *E. faecalis* möglich ist. Jedoch weichen die verwendeten therapeutischen Parameter häufig stark voneinander ab und sind für die jeweiligen Systeme sehr unterschiedlich. Nachfolgend sind einige repräsentative Studien aufgeführt, die einen Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie zulassen.

Die photodynamische Behandlung von *E. faecalis* erfolgte bisher vorwiegend mit dem Photosensitizer Methylenblau.

Foschi et al. erzielten im Wurzelkanal durch die Inkubation von *E. faecalis* mit  $6,25\text{ }\mu\text{g/ml}$  Methylenblau und anschließender Bestrahlung der Mikroorganismen mit Laserlicht (662 nm,  $60\text{ J/cm}^2$ ) eine bakterielle Suppression von 77,5 % (Foschi et al. 2007). Im Vergleich hierzu führte in der vorliegenden Studie die photodynamische Behandlung der Spezies mit  $50\text{ }\mu\text{M}$  mTHPC und einer Lichtenergiedichte von  $50\text{ J/cm}^2$  zu einer deutlich stärkeren bakteriellen Reduktion um 6,3 log-Schritte (99,9 %).

Soukos et al. wendeten den Farbstoff Methylenblau in einer Konzentration von  $25\text{ }\mu\text{g/ml}$  an und erzielten nach endodontischer Lichtapplikation (665 nm,  $30\text{ J/cm}^2$ ) eine Abnahme der bakteriellen Wachstumsrate um 53 % (Soukos et al. 2006). In der vorliegenden

Studie hingegen wurde durch die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  liposomalem mTHPC und Laserbestrahlung mit 25  $\text{J}/\text{cm}^2$  eine bakterielle Reduktion von 6,0 log-Schritten (99,9 %) erreicht.

In einer weiteren Studie von George et al. kamen 100  $\mu\text{M}$  Metylenblau als Photosensibilisator zur Anwendung, das anschließend mit Laserlicht (664 nm, 63,69  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) bestrahlt wurde. Die photodynamische Behandlung hatte eine Suppression von ca. 1,5 log-Schritten zur Folge (George und Kishen 2008). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie jedoch zeigen, kann *E. faecalis* mit 50  $\mu\text{M}$  mTHPC und einer Lichtenergiedichte von 75  $\text{J}/\text{cm}^2$  sogar um ca. 7 log-Schritte supprimiert werden.

Kürzlich untersuchten Schlafer et al. die photodynamische antibakterielle Wirkung von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Toluidinblau auf *E. faecalis*. Dabei handelt es sich wie bei Methylenblau um ein Phenothiazin. Nach der Bestrahlung der Suspension mit rotem LED-Licht (628nm, 1  $\text{J}/\text{s}$ , 30 s) konnte eine Abnahme der KBE/ml um ca. 3 log-Schritte nachgewiesen werden (Schlafer et al. 2010). Hingegen führte in der vorliegenden Studie die Lichtbestrahlung der mit 50  $\mu\text{M}$  mTHPC versetzten bakteriellen Suspension für 33 s (1 W) bereits zu einer vollständigen Suppression von *E. faecalis*.

Maisch et al. untersuchten die photodynamische antibakterielle Wirkung von verschiedenen Haematoporphyrinderivaten auf *E. faecalis*. Bei Haematoporphyrin handelt es sich um einen photosensiblen Farbstoff, der mit mTHPC (Chlorin) strukturell verwandt ist. Die Inkubation mit 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eines dieser Derivate und die anschließende Bestrahlung mit blauem LED-Licht (19,3  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) hatte eine bakterielle Abnahme von ca. 6 log-Schritten zur Folge (Maisch et al. 2009). Im Vergleich hierzu, führte die photodynamische Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  mTHPC und 25  $\text{J}/\text{cm}^2$  ebenfalls zu einer bakteriellen Suppression von 6 log-Schritten.

Wie die Ergebnisse der oben beschriebenen Studien jedoch zeigen, konnte keine der genannten Arbeitsgruppen eine vollständige photodynamische Suppression von *E. faecalis* erreichen.

Um die Wirkung der aPDT-Behandlung im Allgemeinen nachhaltig zu steigern, wird gegenwärtig versucht, die Photosensibilisatoren an ein geeignetes Trägermedium (Carrier) zu binden, um die Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle mit der Bakterienzelle zu erhöhen.

Wie Shrestha et al. kürzlich feststellten, kann beispielsweise durch Kopplung an kationisches Chitosan, einem aus Chitin gewonnenen Polysaccharid, die photodynamische antimikrobielle Wirkung des PS Rose Bengal signifikant verbessert werden. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten weiterhin, dass Chitosan dabei eine permeabilisieren-

de Wirkung auf die Zellwand hat. Dadurch nimmt die Diffusion an Farbstoffmolekülen in das Zellinnere zu, wodurch der photodynamische Effekt verstärkt wird (Shrestha und Kishen 2012).

Eine permeabilisierende Wirkung der in der vorliegenden Studie als Trägermedium für mTHPC verwendeten neutralen Liposome wurde bisher nicht beschrieben. Jedoch kann wie bereits von Tsai et al. postuliert, davon ausgegangen werden, dass sich die Wasserlöslichkeit des hydrophoben Farbstoffs durch die Anbindung verbessert hat. Die Arbeitsgruppe vermutete weiterhin, dass durch die Kopplung an Liposome das „self-quenching“ der Farbstoffmoleküle ebenfalls abnimmt und somit eine Effizienzsteigerung der Methode bewirkt (Tsai et al. 2009).

Im Allgemeinen wird durch die Kombination von PS und Nanopartikeln der Transport der Farbstoffmoleküle in die Mikroorganismen verbessert. (Perni et al. 2011).

Als besonders vielversprechend gilt gegenwärtig die Kopplung der Photosensibilisatoren an biokompatible und biodegradierbare Systeme wie z.B. Liposomen und Polymerisate aus Milch- und Glycolsäure. Gegenüber den frei in der Lösung befindlichen PS-Molekülen weisen die an Trägersubstanzen gebundenen Farbstoffe bestimmte Vorteile auf, die zum Teil auch für die Ergebnisse der vorliegenden Studie zutreffen.

Wie von Pagonis et al. und Perni et al. beschrieben, ist aufgrund der Oberflächenladung der Partikel eine selektive Anbindung der Komplexe an die bakterielle Zellwand möglich. Dadurch nimmt die Interaktion der PS-Moleküle mit der Zielzelle zu. Zudem erhöht sich durch die Anbindung an ein geeignetes Trägermedium ebenfalls die intrazelluläre Verweildauer des PS. (Pagonis et al. 2010, Perni et al. 2011)

Von einer gesteigerten Interaktion der mTHPC-Moleküle mit der bakteriellen Zellwand kann auch in der vorliegenden Studie ausgegangen werden. Jedoch ist aufgrund des neutralen Charakters der Liposome eine selektive Anbindung der Farbstoffmoleküle relativ unwahrscheinlich.

Wie bei Tsai et al. bereits beschrieben, machen Pagonis et al. und Perni et al. ebenfalls eine verbesserte Wasserlöslichkeit der gebundenen PS für die Effizienzsteigerung verantwortlich. Die Autoren schlussfolgern weiterhin, dass durch die Verbindung von hydrophoben PS und liposomalen Trägerstoffen die Agglomeration der Farbstoffmoleküle in wässriger Umgebung signifikant abnimmt. Dadurch steigt die Menge an verfügbaren PS in einem System an und erhöht so die Ausbeute an reaktiven Sauerstoffspezies. (Tsai et al. 2009, Pagonis et al. 2010, Perni et al. 2011).

Die Zellwand der meisten Bakterienspezies weist aufgrund der hohen Anzahl an Lipoteichonsäuren und Lipopolysacchariden eine negative Oberflächenladung auf. Um die

Interaktion von ungeladenen bzw. anionischen PS mit der Bakterienzelle weiter zu steigern, werden diese häufig an ein Trägersystem mit positiver Gesamtladung gebunden. In der vorliegenden Studie wurden jedoch Liposome mit einer neutralen Oberflächenladung verwendet. Möglicherweise kann durch die Anbindung von mTHPC an positiv geladene Liposome die antimikrobielle photodynamische Wirkung noch weiter gesteigert werden.

Ferro et al. untersuchten die photodynamische Wirkung von Haematoporphyrin gekoppelt an liposomale Strukturen mit unterschiedlicher Oberflächenladung auf Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (MRSA). Neben der Effizienz von ungebundenem PS wurde auch die Wirkung nach Kopplung an das monokationische Lipid N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium-methylsulfat (DOTAP) sowie an die neutralen Fettsäurederivate DL- $\alpha$ -dipalmitoyl-phosphatidyl-cholin (DPPC) und L- $\alpha$ -di-miristoyl-phosphatidyl-cholin (DMPC) untersucht. Wie die Ergebnisse zeigen, führte die Inkubation mit dem positiv geladenen DOTAP-Komplex zu der stärksten intrazellulären Anreicherung von PS (Ferro et al. 2006).

In der vorliegenden Studie erfolgte die Photosensibilisierung von *E. faecalis* mit mTHPC, welches in neutral geladenen Liposomen bestehend aus 18 mg/ml Dipalmitoyl-phosphatidylcholin und 2 mg/ml Dipalmitoyl-phosphatidylglycerol angereichert wurde. Wie Untersuchungen von Lüthi et al. demonstrieren, können die grampositiven oralpathogenen Bakterienspezies *S. mutans* und *S. sobrinus* mit der identischen Formulierung ebenfalls signifikant supprimiert werden. Für die vollständige Erradikation von *S. sobrinus* war eine mTHPC-Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und für *S. mutans* von lediglich 0,625  $\mu\text{g}/\text{ml}$  notwendig (Lüthi et al. 2009). Im Gegensatz hierzu war in der vorliegenden Studie für die vollständige Supprimierung von *E. faecalis* eine mTHPC Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  notwendig. Ebenfalls erfolgte bei Lüthi et al. die Aktivierung des PS mit blauem Licht (400-505 nm) und nicht wie in der vorliegenden Studie mit rotem Laserlicht (652 nm).

Engelhardt et al. beschrieben die photodynamische Effizienz von Fospeg auf *S. aureus*. Dabei handelt es sich um eine mit Foslipos vergleichbare liposomale mTHPC-Formulierung. Die Applikation von rotem Halogenlicht ( $75 \text{ mW cm}^{-2}$ , 30 min) resultiert jedoch lediglich in einer Reduktion der Spezies um 4-5 log Schritte (Engelhardt et al. 2010).

Um die antibakterielle Effizienz der photodynamischen Behandlung mit mTHPC nachhaltig zu steigern, modifizierten Bombelli et al. liposomale DPPC-Carrier mit verschiedenen kationischen I-Prolinol-Derivaten. Nach der Inkubation der Bakterien für 30 min

mit den modifizierten Trägersystemen, die eine Gesamtkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  mTHPC enthielten, wurde die Suspension mit gefiltertem weißen Mischlicht bestrahlt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass mit den kationischen Trägersystemen, im Vergleich zu frei in der Lösung befindlichem mTHPC, eine signifikant höhere bakterielle Reduktion erreicht werden kann (Bombelli et al. 2008).

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, konnte mit der identischen mTHPC-Konzentration eine photodynamische Suppression von *E. faecalis* um 5,8 log-Schritte erzielt werden. Möglicherweise könnte eine Modifikation der Liposome mit dem von Bombelli et al. vorgestellten I-Prolinol-Derivat die Suppression dieser Spezies signifikant verbessern.

Einen anderen Ansatz verfolgte die Arbeitsgruppe um Yang et al., die mTHPC-haltige Liposome mit dem amphiphilen Peptid WLBU2 modifizierten und dessen photodynamische Wirkung ebenfalls auf *S. aureus* untersuchten (Yang et al. 2011). Bei WLBU2 handelt es sich um ein kationisches Peptid aus 24 Aminosäuren, das nachweislich eine antibakterielle Wirkung auf Bakterien besitzt (Deslouches et al. 2005, Novak et al. 2007, Skinner et al. 2010).

Die oben genannte Arbeitsgruppe verglich dabei die photodynamische Wirkung der mit WLBU2 modifizierten Liposome mit der von Fospeg. Beide liposomalen Formulierungen enthielten 1,25  $\mu\text{M}$  mTHPC und wurden vor der Bestrahlung mit Laserlicht (652 nm, 100  $\text{Jcm}^{-2}$ ) für 180 min mit den Bakterien in völliger Dunkelheit inkubiert. Wie die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, führte die photodynamische Behandlung mit den WLBU2-Liposomen zu einer vollständigen Suppression von *S. aureus*, wobei mit Fospeg lediglich eine Reduktion von 2.6 log-Schritten erzielt werden konnte (Yang et al. 2011). Da es sich bei Fospeg um eine mit Foslipos vergleichbare liposomale Formulierung handelt, ist es wahrscheinlich, dass durch eine Modifikation der in der vorliegenden Studie verwendeten Liposome mit WLBU2 ebenfalls eine suffiziente Steigerung der antimikrobiellen Wirkung auf *E. faecalis* erreicht werden kann.

In einer aktuellen Studie der selben Arbeitsgruppe wurde die Anreicherung von mTHPC in *S. aureus* untersucht. Als Träger für den Photosensibilisator kamen Liposome zur Anwendung, deren Oberfläche mit einem kationischen Lektin modifiziert wurden waren. Nach der Inkubation der Zellen mit der Formulierung konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der konventionelle Liposome verwendet wurden, eine signifikant höhere intrazelluläre mTHPC-Konzentration nachgewiesen werden. Die anschließende Applikation von Laserlicht führte zur vollständigen Supprimierung von *S. aureus* (Yang et al. 2012).

Im Gegensatz zu den beschriebenen Ergebnissen führte in der vorliegenden Studie die Behandlung mit neutral geladenen mTHPC-Liposomen bereits zu einer vollständigen bakteriellen Suppression.

Wie die Ergebnisse der oben beschriebenen Arbeiten zeigen, wurden für die Supprimierung der Bakterienspezies häufig lange Bestrahlungszeiten verwendet. Im Vergleich dazu führte in der vorliegenden Studie die Bestrahlung der photosensibilisierten Bakterien für lediglich 33 s mit rotem Laserlicht (652 nm) bei einer Ausgangsleistung des Diodenlasers von 1 W bereits zur vollständigen Suppression.

Einige der bereits erwähnten Autoren nutzten für die Aktivierung von mTHPC Mischlicht oder Licht im blauen Spektralbereich (Bombelli et al. 2008, Lüthi et al. 2009). Da der PS eine besonders hohe Absorptionsbande bei 420 nm aufweist, ist eine Aktivierung des Moleküls mit blauen Licht ebenfalls möglich. Weitere Absorptionsmaxima befinden sich zudem bei 284, 306, 516, 543, 591 sowie bei 652 nm und ermöglichen daher eine effiziente Anregung des PS auch mit polychromatischem Licht.

In der vorliegenden Studie wurde jedoch lediglich die Wirkung des PS nach Aktivierung mit rotem Laserlicht der Wellenlänge 652 nm untersucht.

In der onkologischen photodynamischen Behandlung wird mTHPC ausschließlich mit rotem Laserlicht der Wellenlänge 652 nm angeregt. Im Vergleich zu den kurzwelligeren Spektren weist rotes Licht eine wesentlich höhere Gewebepenetration auf, wodurch auch in tieferen Gewebeschichten ein ausreichender photodynamischer Effekt erzielt werden kann.

Daher ist für eine effiziente Anregung von mTHPC im mit *E. faecalis* infizierten Wurzelkanalsystem ebenfalls eine Bestrahlung mit rotem Laserlicht denkbar, um eine suffiziente antimikrobielle Wirkung der Methode im Wurzelkanalsystem und dem angrenzenden Dentin zu erzielen.

Um eine klinische Anwendung des PS im Rahmen der endodontischen Therapie zu ermöglichen, ist eine ausreichende Eindringtiefe von Aktivierungslicht und Farbstoff in das Dentin erforderlich. Im Allgemeinen werden für die Wurzelkanalbestrahlung endodontische Lichtapplikatoren verwendet, die eine vollständige Ausleuchtung des gesamten Kanalsystems ermöglichen (Garcez et al. 2012).

In der vorliegenden Studie kam ein auf das System abgestimmter Lichtdiffusor zur Anwendung, wodurch ebenfalls eine vollständige Bestrahlung der Wells erreicht werden konnte.

Im Wurzelkanalsystem breitet sich das eingestrahlte Licht entlang der Dentintubuli aus, die als Lichtleiter fungieren. Dabei scheint die Dentindichte keinen Einfluss auf die Licht-



transmission zu haben (Odor et al. 1999, Turrioni et al. 2012).

Zusätzliche Stoffe, die die Lichtleitung beeinflussen können, wurden in der vorliegenden Studie allerdings nicht in die bakterielle Suspension eingebracht.

Nagata et al. untersuchten die Penetration von Mischlicht (375-525 nm, 232 mW) in humanem Dentin und stellten eine effektive Eindringtiefe von bis zu 2,5 mm fest. In der gleichnamigen Studie wurde ebenfalls die tubuläre Penetration des PS Erythrosin ermittelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min konnte eine Eindringtiefe des Farbstoffs bis zu 850  $\mu\text{m}$  nachgewiesen werden (Nagata et al. 2012).

Da *E. faecalis* wahrscheinlich eine Penetration von bis zu 600  $\mu\text{m}$  aufweisen kann, ist eine wirkungsvolle photodynamische Suppression der Spezies in den Dentintubuli theoretisch möglich (Parmar et al. 2011). Jedoch ist die Farbstoffdiffusion im Dentin von verschiedenen Faktoren wie der Molekülgröße und der Oberflächenladung abhängig.

Die Penetrationsweite von Foslipos und Laserlicht (652 nm) in humanem Dentin wurde in der vorliegenden Studie allerdings nicht untersucht.

Ab einer bestimmten Intensität kann Lichtenergie auch thermische Schäden an Zellen verursachen (Hellingwerf et al. 1996). Durch die Zufuhr des Laserlichts wurde in der vorliegenden Studie ein maximaler Temperaturanstieg in der bakteriellen Suspension von 6 °C gemessen. Anhand der vorliegenden Daten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit 100 J/cm<sup>2</sup> keinen signifikanten thermischen Einfluss auf die bakterielle Wachstumsrate hatte.

Auch Nagayoshi et al. registrierten nach Bestrahlung der Kanalwand mit einem Diodenlaser einen Anstieg der Temperatur. Während der Lichtapplikation (805 nm, 5 W) für 60 s stieg die Temperatur im Kanal bis auf 65 °C an. Die Arbeitsgruppe stellte jedoch keine thermische Suppression von *E. faecalis* fest (Nagayoshi et al. 2011).

Nach der Applikation von Laserlicht (652 nm, 1 W) für 33 s wurde in der vorliegenden Studie in der bakteriellen Suspension eine Maximaltemperatur von 31,6 °C gemessen. Wie bereits erwähnt, führte der Energieeintrag zu keiner signifikanten Beeinflussung des bakteriellen Wachstums.

Dickers et al. (2009) untersuchten im Rahmen einer endodontischen aPDT-Behandlung den Temperaturverlauf auf der Wurzeloberfläche. Die intrakanaläre Bestrahlung mit einer Energiedichte von 106 J/cm<sup>2</sup> verursachte auf der Wurzeloberfläche lediglich einen Temperaturanstieg von 0,16 °C. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte aus den erhobenen Daten, dass die endodontische photodynamische Behandlung keine thermische Schädigung der parodontalen Hart- und Weichgewebe hervorruft (Dickers et al. 2009).

Da in der vorliegenden Studie für die vollständige Suppression von *E. faecalis* eine Licht-

energie von  $100 \text{ J/cm}^2$  notwendig war, ist bei einer Anwendung des Verfahrens im Rahmen der Wurzelkanal desinfektion möglicherweise von einem ähnlichen Temperaturverlauf auf der Wurzeloberfläche auszugehen.

In der hier vorgelegten Studie konnte für die antibakterielle Effizienz der aPDT-Methode eine Abhängigkeit von der verwendeten Photosensitizerkonzentration sowie der applizierten Lichtenergie nachgewiesen werden. Eine Verringerung der PS-Konzentration ( $< 50 \mu\text{M}$ ) und eine Reduktion der Aktivierungsenergie ( $< 100 \text{ J/cm}^2$ ) führten zu einer unvollständigen Suppression von *E. faecalis*.

Auch Ergebnisse anderer Autoren bestätigten, dass die antibakterielle Wirkung der aPDT von der Art des verwendeten PS, dessen Konzentration sowie von der Menge an zugeführter Lichtenergie bestimmt wird (Maisch et al. 2009, Usacheva et al. 2001).

Für eine zukünftige klinische Anwendung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten aPDT-Verfahrens müssen die Laserlichtenergie und die PS-Konzentration optimal aufeinander abgestimmt sein, um eine effiziente Wirksamkeit zu erzielen.

Aufgrund der Zytotoxizität mancher PS führt die Inkubation der Mikroorganismen mit den jeweiligen Farbstoffen auch ohne Lichtaktivierung zu einer bakteriellen Suppression (Foschi et al. 2007, George und Kishen 2008).

In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls ein dunkeltoxischer Effekt von mTHPC nachgewiesen werden. Die Inkubation (15 min) der Bakterien mit 30 und  $50 \mu\text{M}$  mTHPC resultierte in einer Verringerung der Wachstumsrate zwischen 1,4 und 1,5 log-Schritten. Andere Autoren stellten fest, dass die Inkubation mit Methylenblau ( $44 \mu\text{M}$ ) und Touludinblau O ( $6 \mu\text{M}$ ) dagegen bereits eine Bakterienreduktion von 6,3 bzw. 6,8 log-Schritten induzieren kann (Usacheva et al. 2001). Jedoch wurden in der beschriebenen Studie wesentlich längere Inkubationszeiten als in der vorliegenden Untersuchung verwendet.

In der hier vorgelegten Studie wurde zudem der Einfluss der photodynamischen Behandlung auf die Integrität der Zellwand untersucht. Zur Anwendung kam der BacLight<sup>TM</sup> Vitalitätstest, der eine fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung zwischen vitalen und geschädigten Zellen zulässt. Wie die Auswertung der Versuchsreihe zeigt, waren nach der photodynamischen Behandlung mit mTHPC keine vitalen Bakterien in den Testansätzen mehr nachweisbar. Alle geschädigten Zellen erschienen in einer roten Fluoreszenz, die durch Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid an das bakterielle Genom hervorgerufen wurde. Eine Diffusion des Farbstoffs in das Zellinnere ist allerdings nur nach dem Verlust der funktionellen Integrität der Zellwand gegeben. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung führen daher zu der Annahme, dass die photodynamische Behandlung irreversible Schäden an der bakteriellen Zellwand hervorruft.

Eine Abhängigkeit der Destruktion von der PS-Konzentration oder der zur Aktivierung verwendeten Lichtenergie konnten jedoch nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse der hier dargestellten Untersuchung korrelieren zudem mit den ermittelten Werten der Zellzahlbestimmung (KBE/ml).

Neben dem Einfluss der aPDT auf die Integrität der Zellwand wurden in der vorliegenden Studie auch die Vitalität der Bakterien nach Dunkelinkubation mit 50  $\mu\text{M}$  mTHPC und nach alleiniger Bestrahlung mit Laserlicht (100  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass in allen Testansätzen überwiegend vitale grün fluoreszierende Zellen nachweisbar waren. Eine quantitative Auswertung durch Messung der Fluoreszenzhelligkeiten erfolgte allerdings nicht.

Ein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Zellkulturtests und der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung nach aPDT konnte auch von Collins et al. für *P. aeruginosa* festgestellt werden. Die photodynamische Behandlung mit 225  $\mu\text{M}$  eines Porphyrinderivats zeigte in der Fluoreszenzdarstellung eine vollständige Biofilmdestruktion sowie überwiegend rot fluoreszierende geschädigte Zellen. Die Auswertung der Zellkulturtests nach aPDT ergaben eine bakterielle Reduktion von 4,1 log-Schritten. Zudem wurde in der gleichnamigen Studie eine vollständige photodynamische Degradierung der bakteriellen Plasmiden-DNA festgestellt (Collins et al. 2010). Eine Schädigung des Genoms von *E. faecalis* nach Anwendung der aPDT wurde bisher lediglich von George et al. nachgewiesen (George und Kishen 2008).

Weitere Versuche von Wong et al. und Sahu et al. dokumentieren, dass der durch die photodynamische Behandlung verursachte Verlust der Membranstabilität einen Austritt von zytoplasmatischer Flüssigkeit zur Folge hat. Die Stärke des Effektes war dabei von der verwendeten Energiedichte abhängig. Resultierend aus dem Volumenverlust konnte nach der Therapie zudem eine Zunahme der Oberflächenrauheit, ein Abflachen der Zellen sowie ein Verlust der Verbindung zwischen Zellmembran und Zellwand beobachtet werden (Wong et al. 2005, Sahu et al. 2009).

Eine Veränderung der Zellmorphologie nach der aPDT-Behandlung war in der vorliegenden Studie lichtmikroskopisch nicht nachweisbar.

Ebenfalls konnte bisher kein schädigender Einfluss von mTHPC auf das bakterielle Genom beobachtet werden. Jedoch kann aufgrund der hohen intrazellulären Anreicherung des Farbstoffs auch von einer möglichen photodynamischen Destruktion der DNA ausgegangen werden (Yang et al. 2011).

Wie die dargestellten Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, ist eine Schädigung der Zellwand möglicherweise die Hauptursache für die Suppression von *E. faecalis*. Zudem

konnte festgestellt werden, dass die antibakterielle Wirkung der photodynamischen Behandlung maßgeblich von der verwendeten mTHPC-Konzentration und der applizierten Lichtenergie beeinflusst wird. Für eine klinische Anwendung der Methode sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, die die antimikrobielle Wirkung von Foslipos im infizierten Wurzelkanal verifizieren.

## 6 Schlussfolgerungen

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, kann *E. faecalis* mittels aPDT unter Verwendung der liposomalen mTHPC-Formulierung vollständig supprimiert werden.

Die beschriebene Methode ist dazu geeignet, die antimikrobielle photodynamische Wirkung von liposomalen mTHPC zu untersuchen.

In den vorliegenden Versuchen wurde keine thermische Schädigung und lediglich eine geringe Dunkeltoxizität des PS festgestellt. Die suppressive Wirkung kann deshalb der photodynamischen Reaktion zugeschrieben werden.

Da die antiseptische Wirkung auf eine irreversible Schädigung der Zellwand zurückgeführt werden kann, ist bei einer klinischen Anwendung auch nicht von einer Resistenzentwicklung auszugehen.

Die photodynamische Behandlung mit dem PS mTHPC stellt eine potentielle antiseptische Methode dar, um *E. faecalis* effizient zu supprimieren.

Die Versuchsdurchführung erfolgte anhand eines eukaryotischen Modells. Bisher lässt sich keine Aussage über die mögliche Wirkung der Methode auf einen endodontischen Biofilm ableiten.

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um eine Optimierung der Parameter für eine zukünftige In-vivo-Anwendung im Rahmen der endodontischen Desinfektion festzulegen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11):5721–5732.
- Alves E, Costa L, Carvalho CMB, Tomé JPC, Faustino MA, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Cunha A, Almeida A. 2009. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol*, Online verfügbar.
- Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. 2009. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod*, 35(5):711–714.
- Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. 2007. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J*, 52(1):64–82.
- Banerjee I, Mondal D, Martin J, Kane RS. 2010. Photoactivated antimicrobial activity of carbon nanotube-porphyrin conjugates. *Langmuir*, 26(22):17369–17374.
- Basrani B. 2011. Irrigation in endodontic treatment. *Alpha Omegan*, 104(1-2):18–25.
- Berlanda J, Kiesslich T, Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. 2010. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *J Photochem Photobiol B*, 100(3):173–180.
- Bezman SA, Burtis PA, Izod TP, Thayer MA. 1978. Photodynamic inactivation of *E. coli* by rose bengal immobilized on polystyrene beads. *Photochem Photobiol*, 28(3):325–329.
- Bombelli C, Bordi F, Ferro S, Giansanti L, Jori G, Mancini G, Mazzuca C, Monti D, Ricchelli F, Sennato S, Venanzi M. 2008. New cationic liposomes as vehicles of m-tetrahydroxyphenylchlorin in photodynamic therapy of infectious diseases. *Mol Pharm*, 5(4):672–679.

- Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. 1989. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J*, 261(1):277–280.
- Buchholz J, Kaser-Hotz B, Khan T, Bley CR, Melzer K, Schwendener RA, Roos M, Walt H. 2005. Optimizing photodynamic therapy: in vivo pharmacokinetics of liposomal meta-(tetrahydroxyphenyl)chlorin in feline squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11(20):7538–7544.
- Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. 2007. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 21(3):293–302.
- Chen M, Liu X, Fahr A. 2011. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *Int J Pharm*, 408(1-2):223–234.
- Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. 2010. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol*, 61(5):411–416.
- Costa L, Tomé JPC, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Faustino MAF, Cunha A, Gomes NCM, Almeida A. 2011. Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. *Antiviral Res*, 91(3):278–282.
- Deslouches B, Islam K, Craigo JK, Paranjape SM, Montelaro RC, Mietzner TA. 2005. Activity of the de novo engineered antimicrobial peptide WLBU2 against *Pseudomonas aeruginosa* in human serum and whole blood: implications for systemic applications. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(8):3208–3216.
- Dickers B, Lamard L, Peremans A, Geerts S, Lamy M, Limme M, Rompen E, Moor RJGD, Mahler P, Rocca JP, Nammour S. 2009. Temperature rise during photo-activated disinfection of root canals. *Lasers Med Sci*, 24(1):81–85.
- Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. 2011. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 112(3):396–400.

- Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*, 38(8):2628–2635.
- Dougherty TJ, Lawrence G, Kaufman JH, Boyle D, Weishaupt KR, Goldfarb A. 1979. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 62(2):231–237.
- Dragicevic-Curic N, Gräfe S, Gitter B, Fahr A. 2010. Efficacy of temoporfin-loaded invasomes in the photodynamic therapy in human epidermoid and colorectal tumour cell lines. *J Photochem Photobiol B*, 101(3):238–250.
- Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A. 2009. Development of liposomes containing ethanol for skin delivery of temoporfin: characterization and in vitro penetration studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 74(1):114–122.
- Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. 2010. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci*, 9(3):365–369.
- Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. 2007. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J*, 40(2):85–93.
- Estrela C, Silva JA, de Alencar AHG, Leles CR, Decurcio DA. 2008. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*—a systematic review. *J Appl Oral Sci*, 16(6):364–368.
- Facklam RR, Carvalho M, Teixeira L. 2002. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, Hrsg. *The Enterococci - Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Erste Aufl. Washington DC: ASM Press, 1–54.
- Ferro S, Ricchelli F, Mancini G, Tognon G, Jori G. 2006. Inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by liposome-delivered photosensitising agents. *J Photochem Photobiol B*, 83(2):98–104.



- Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner ACR, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. 2008. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*, 34(6):728–734.
- Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6):1749–1757.
- Fonseca MB, Júnior POT, Pallota RC, Filho HF, Denardin OVP, Rapoport A, Dedivitis RA, Veronezi JF, Genovese WJ, Ricardo ALF. 2008. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg*, 26(3):209–213.
- Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, Pagonis TC, Kent R, Stashenko PP, Soukos NS. 2007. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med*, 39(10):782–787.
- Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spångberg LS. 2005. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 99(1):112–118.
- Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H, Ribeiro MS. 2012. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? *Lasers Med Sci*, Online verfügbar.
- Garcez AS, Ribeiro MS, Tegós GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. 2007. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*, 39(1):59–66.
- George M, Ivancaková R. 2007. Root canal microflora. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 50(1):7–15.
- George S, Kishen A. 2007. Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, 33(5):599–602.
- George S, Kishen A. 2008. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem Photobiol*, 84(3):734–740.

- Gil-Tomas J, Tubby S, Parkin IP, Narband N, Dekker L, Nair SP, Wilson M, Street C. 2007. Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* using a toluidine blue O-tiopronin-gold nanoparticle conjugate. *Journal of Materials Chemistry*, 17(35):3739–3746.
- Giles LH, Chan SN, Jarad F, Hope C. 2010. The efficacy of different endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* in an extracted human tooth model. *Int Endod J*, 43(4):351–353.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. 2004. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*, 19(2):71–76.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. 2008. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod*, 34(5):537–540.
- Goulart RC, Thedei G, Souza SLS, Tedesco AC, Ciancaglini P. 2010. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg*, 28(1):85–90.
- Guo Y, Rogelj S, Zhang P. 2010. Rose Bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of gram-positive bacteria. *Nanotechnology*, 21(6):1–7.
- Haapasalo M. 1993. Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 6(2-3):213–217.
- Hamblin MR, Mroz P. 2008. *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*. Erste Aufl. Norwood: Artech House Inc.
- Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. 2010. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J*, 43(11):968–977.
- Hellingwerf KJ, Hoff WD, Crielgaard W. 1996. Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signalling. *Mol Microbiol*, 21(4):683–693.
- Hofman JW, Carstens MG, van Zeeland F, Helwig C, Flesch FM, Hennink WE, van Nostrum CF. 2008. Photocytotoxicity of mTHPC (temoporfin) loaded polymeric micelles mediated by lipase catalyzed degradation. *Pharm Res*, 25(9):2065–2073.

- van Hoogevest P, Liu X, Fahr A. 2011. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective. *Expert Opin Drug Deliv*, 8(11):1481–1500.
- Hornung R, Jentsch B, Crompton NE, Haller U, Walt H. 1997. In vitro effects and localisation of the photosensitizers m-THPC and m-THPC MD on carcinoma cells of the human breast (MCF-7) and Chinese hamster fibroblasts (V-79). *Lasers Surg Med*, 20(4):443–450.
- Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FWG, Silva LABD, Leonardo MR, Nelson-Filho P. 2011. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent*, 21(5):353–360.
- Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP. 2004. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 3(14):1–11.
- Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. 2006. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*, 38(5):468–481.
- Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P. 2009. Root canal medicaments. *Int Dent J*, 59(1):5–11.
- Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, Ørstavik D. 2009. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *J Endod*, 35(1):46–49.
- Kayser F, Böttger E, Zinkernagel R, Haller O, Eckert J, Deplazes P. 2010. Taschenbuch Medizinische Mikrobiologie. Zwölfte Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag, 258.
- Kübler AC, Haase T, Staff C, Kahle B, Rheinwald M, Mühling J. 1999. Photodynamic therapy of primary nonmelanomatous skin tumours of the head and neck. *Lasers Surg Med*, 25(1):60–68.
- Kick G, Messer G, Plewig G. 1996. Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie. *Der Hautarzt*, 47(8):644–649.

- Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol*, 88(2-3):269–290.
- Klare I, Werner G, Witte W. 2010. Enterokokken mit Vancomycin-Resistenz in deutschen Krankenhäusern 2008/2009 - Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. *Epidemiologisches Bulletin*, 44:427–436.
- Klimm W. 2011. Endodontologie: Lehrbuch für Studium und Beruf. Zweite Aufl. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag.
- Konan YN, Gurny R, Allémann E. 2002. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 66(2):89–106.
- Konopka K, Goslinski T. 2007. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*, 86(8):694–707.
- Kubin A, Wierrani F, Jindra RH, Loew HG, Grünberger W, Ebermann R, Alth G. 1999. Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and photofrin II on *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp Clin Res*, 25(1):13–21.
- Kuntsche J, Freisleben I, Steiniger F, Fahr A. 2010. Temoporfin-loaded liposomes: physicochemical characterization. *Eur J Pharm Sci*, 40(4):305–315.
- Kustarci A, Sümer Z, Altunbas D, Kosum S. 2009. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107(5):73–79.
- Ledezma-Rasillo G, Flores-Reyes H, Gonzalez-Amaro AM, Garrocho-Rangel A, del Socorro Ruiz-Rodriguez M, Pozos-Guillen AJ. 2010. Identification of cultivable microorganisms from primary teeth with necrotic pulps. *J Clin Pediatr Dent*, 34(4):329–333.
- Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4):999–1007.
- Lim Z, Cheng JL, Lim TW, Teo EG, Wong J, George S, Kishen A. 2009. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Aust Dent J*, 54(2):108–114.

- Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. 1991. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 71(5):603–611.
- Lin S, Kfir A, Laviv A, Sela G, Fuss Z. 2009. The in vitro antibacterial effect of iodine-potassium iodide and calcium hydroxide in infected dentinal tubules at different time intervals. *J Contemp Dent Pract*, 10(2):59–66.
- Love RM. 2001. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*, 34(5):399–405.
- Love RM, McMillan MD, Jenkinson HF. 1997. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun*, 65(12):5157–5164.
- Lüthi M, Gyenge EB, Engström M, Bredell M, Grätz K, Walt H, Gmür R, Maake C. 2009. Hypericin- and mTHPC-mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Medical Laser Application*, 24(4):227–236.
- Luksiene Z. 2003. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)*, 39(12):1137–1150.
- Ma L, Moan J, Berg K. 1994. Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetrahydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: a comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. *Int J Cancer*, 57(6):883–888.
- Maisch T. 2009. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem*, 9(8):974–983.
- Maisch T, Wagner J, Papastamou V, Nerl HJ, Hiller KA, Szeimies RM, Schmalz G. 2009. Combination of 10 percent EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro. *J Appl Microbiol*, 107(5):1569–1578.
- Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. 2005. Enterococcal resistance—an overview. *Indian J Med Microbiol*, 23(4):214–219.
- Martin H. 1991. Cleanliness, disinfection, and sterilization of the root canal. *Curr Opin Dent*, 1(6):734–736.

- Meire MA, Prijck KD, Coenye T, Nelis HJ, Moor RJGD. 2009. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J*, 42(4):351–359.
- Miranda TT, Vianna CR, Rodrigues L, Monteiro AS, Rosa CA, Corrêa A. 2009. Diversity and frequency of yeasts from the dorsum of the tongue and necrotic root canals associated with primary apical periodontitis. *Int Endod J*, 42(9):839–844.
- Mohammadi Z, Dummer PMH. 2011. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*, 44(8):697–730.
- Moreno MRF, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, Vuyst LD. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, 106(1):1–24.
- Nagata JY, Hioka N, Terada RSS, Baesso ML, Pelloso DS, Sato FC. 2012. Physical-Chemical Evaluation of Erytrosine in Photodynamic Therapie [Abstract]. Campinas: State University of Campinas.
- Nagayoshi M, Nishihara T, Nakashima K, Iwaki S, Chen KK, Terashita M, Kitamura C. 2011. Bactericidal Effects of Diode Laser Irradiation on *Enterococcus faecalis* Using Periapical Lesion Defect Model. *ISRN Dent*, Online verfügbar.
- Nair PNR. 2006. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*, 39(4):249–281.
- Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. 2005. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after one-visit endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 99(2):231–252.
- Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N, Klepac-Ceraj V, Fontana CR, Kent R, Pagonis TC, Stashenko PP, Soukos NS. 2011. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod*, 37(2):217–222.
- Nisnevitch M, Nakonechny F, Nitzan Y. 2010. Photodynamic antimicrobial chemotherapy by liposome-encapsulated water-soluble photosensitizers. *Bioorg Khim*, 36(3):396–402.
- Novak KF, Diamond WJ, Kirakodu S, Peyyala R, Anderson KW, Montelaro RC, Mietzner TA. 2007. Efficacy of the de novo-derived antimicrobial peptide WLBU2 against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(5):1837–1839.

- Nunes MR, Mello I, Franco GCN, de Medeiros JMF, Santos SSFD, Habitante SM, Lage-Marques JL, Raldi DP. 2011. Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. *Photomed Laser Surg*, 29(12):803–808.
- Ochsner M. 1997. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*, 39(1):1–18.
- Odor TM, Chandler NP, Watson TF, Ford TR, McDonald F. 1999. Laser light transmission in teeth: a study of the patterns in different species. *Int Endod J*, 32(4):296–302.
- O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. 2002. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med*, 31(2):86–90.
- Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, Foschi F, Dunham J, Skobe Z, Yamazaki H, Kent R, Tanner ACR, Amiji MM, Soukos NS. 2010. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod*, 36(2):322–328.
- Papastamou V, Nietzsche T, Staudte H, Orellana G, Sigusch BW. 2011. Photoinactivation of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* using the ruthenium-based RD3 sensitizer and a conventional halogen lamp. *Arch Oral Biol*, 56(3):264–268.
- Parmar D, Hauman CHJ, Leichter JW, McNaughton A, Tompkins GR. 2011. Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J*, 44(7):644–651.
- de Paula Eduardo C, de Freitas PM, Esteves-Oliveira M, Aranha ACC, Ramalho KM, Simões A, Bello-Silva MS, Tunér J. 2010. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers Med Sci*, 25(6):781–792.
- de Paz LEC, Bergenholtz G, Svensäter G. 2010. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod*, 36(1):70–77.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. 2000. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod*, 26(10):593–595.
- Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. 2008. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija*, 10(1):4–9.

- Perni S, Prokopovich P, Pratten J, Parkin IP, Wilson M. 2011. Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*, 10(5):712–720.
- Pfützner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. 2004. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol*, 75(10):1343–1349.
- Pirnat S, Lukac M, Ihan A. 2011. Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria. *Lasers Med Sci*, 26(6):755–761.
- Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. 2009. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*, 24(2):259–268.
- Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. 2001. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J*, 34(3):184–188.
- Portenier I, Waltimo TM, Haapasalo M. 2004. *Enterococcus faecalis* the root canal survivor and star in post-treatment disease. *Endodontic Topics*, 6:135–159.
- Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. 2011. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol*, 15(4):323–327.
- Rôças IN, Siqueira JF. 2012. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*, 50(5):1721–1724.
- Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. 2011. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod*, 37(6):856–859.
- Ruvière DB, Leonardo MR, da Silva LAB, Ito IY, Nelson-Filho P. 2007. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child*, 74(2):118–123.
- Sahu K, Bansal H, Mukherjee C, Sharma M, Gupta PK. 2009. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*, 96(1):9–16.



- Schäfer E. 2001. Struktur der Pulpa und ihre Erkrankungsformen. In: Heidemann D, Hrsg. Endodontie. Vierte Aufl. München: Urban & Fischer Verlag, 2–24.
- Schirrmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, Al-Ahmad A. 2009. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J Endod*, 35(2):169–174.
- Schlafer S, Vaeth M, Hørsted-Bindslev P, Frandsen EVG. 2010. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 109(4):634–641.
- Schär D, Ramseier CA, Eick S, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. 2012. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: six-month outcomes of a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res*, Online verfügbar.
- Schwartz J, Wiehe A, Gräfe S, Gitter B, Eppe M. 2009. Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. *Biomaterials*, 30(19):3324–3331.
- Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. 2004. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol*, 19(2):95–101.
- Senge MO, Brandt JC. 2011. Temoporfin (Foscan®), 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin—a second-generation photosensitizer. *Photochem Photobiol*, 87(6):1240–1296.
- Sharma SK, Dai T, Kharkwal GB, Huang YY, Huang L, Arce VJBD, Tegos GP, Hamblin MR. 2011. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr Pharm Des*, 17(13):1303–1319.
- Shrestha A, Kishen A. 2012. Polycationic Chitosan-Conjugated Photosensitizer for Antibacterial Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*, 88(3):577–583.
- Sigus BW, Engelbrecht M, Völpe A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. 2010. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*, 81(7):975–981.
- Sigus BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. 2005. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol*, 76(7):1100–1105.

- Siqueira JF. 2001. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*, 34(1):1–10.
- Siqueira JF, Rôças IN. 2004. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 97(1):85–94.
- Siqueira JF, Rôças IN. 2007. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*, 18(4):267–280.
- Siqueira JF, Rôças IN. 2008. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*, 34(11):1291–1301.
- Siqueira JF, Rôças IN. 2009. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*, 88(11):969–981.
- Siqueira JF, Rôças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhães FAC, de Uzeda M. 2002. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod*, 28(3):181–184.
- Siqueira JF, Uzeda MD, Fonseca ME. 1996. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod*, 22(6):308–310.
- Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. 1997. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*, 30(5):297–306.
- Skinner MC, Kiselev AO, Isaacs CE, Mietzner TA, Montelaro RC, Lampe MF. 2010. Evaluation of WLBU2 peptide and 3-O-octyl-sn-glycerol lipid as active ingredients for a topical microbicide formulation targeting *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(2):627–636.
- Soares JA, de Carvalho MAR, Santos SMC, Mendonça RMC, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M, Magalhães PP, Santos MH, de Macêdo Farias L. 2010. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*, 36(5):894–898.

- Soukos NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP. 2006. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod*, 32(10):979–984.
- Soukos NS, Goodson JM. 2011. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*, 55(1):143–166.
- Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. 2003. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*, 33(3):161–168.
- Stewart GG. 1955. The importance of chemomechanical preparation of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 8(9):993–997.
- Street CN, Gibbs A, Pedigo L, Andersen D, Loebel NG. 2009. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture. *Photochem Photobiol*, 85(1):137–143.
- Street CN, Pedigo LA, Loebel NG. 2010. Energy dose parameters affect antimicrobial photodynamic therapy-mediated eradication of periopathogenic biofilm and planktonic cultures. *Photomed Laser Surg*, 28(1):61–66.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. 2006. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*, 32(2):93–98.
- Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MGPMS, Tomé JPC, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Cunha A, Gomes NCM, Alves E, Almeida A. 2010. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs*, 8(1):91–105.
- Tsai T, Yang YT, Wang TH, Chien HF, Chen CT. 2009. Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. *Lasers Surg Med*, 41(4):316–322.
- Tseng SP, Teng LJ, Chen CT, Lo TH, Hung WC, Chen HJ, Hsueh PR, Tsai JC. 2009. Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Surg Med*, 41(5):391–397.

- Turrioni APS, de Oliveira CF, Basso FG, Moriyama LT, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA. 2012. Correlation between light transmission and permeability of human dentin. *Lasers Med Sci*, 27(1):191–196.
- Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. 2001. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*, 29(2):165–173.
- Wilson M. 2004. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*, 3(5):412–418.
- Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC. 2005. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(3):895–902.
- Wright KE, Liniker E, Loizidou M, Moore C, MacRobert AJ, Phillips JB. 2009. Peripheral neural cell sensitivity to mTHPC-mediated photodynamic therapy in a 3D in vitro model. *Br J Cancer*, 101(4):658–665.
- Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, Kent R, Soukos NS. 2009. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod*, 35(11):1567–1572.
- Yang K, Gitter B, Rüger R, Albrecht V, Wieland GD, Fahr A. 2012. Wheat Germ Agglutinin Modified Liposomes for the Photodynamic Inactivation of Bacteria. *Photochem Photobiol*, 88(3):548–556.
- Yang K, Gitter B, Rüger R, Wieland GD, Chen M, Liu X, Albrecht V, Fahr A. 2011. Antimicrobial peptide-modified liposomes for bacteria targeted delivery of temoporfin in photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Photochem Photobiol Sci*, 10(10):1593–1601.
- Yavari HR, Rahimi S, Shahi S, Lotfi M, Barhaghi MHS, Fatemi A, Abdolrahimi M. 2010. Effect of Er, Cr: YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Photomed Laser Surg*, 28(1):91–96.
- Zehnder M, Guggenheim B. 2009. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J*, 42(4):277–287.

# 8 Anhang

## 8.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. Dr. Bernd W. Sigusch für die Überlassung des Themas und für die umfassende Betreuung der Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Dipl.-Ing. Andrea Vöpel sowie Frau Silke Tonndorf-Martini und Herrn Dr. Andre Güllmar, die mich in der Durchführung der Versuche, der Auswertung der Ergebnisse und der Anfertigung der Publikationsschrift allseits tatkräftig unterstützten und mir mit unermüdlicher Geduld zur Seite standen.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der biolitec AG, insbesondere bei Herrn Professor Dr. Volker Albrecht und Dr. Burkhard Gitter, für die Versuchsplanung und die Bereitstellung des Photosensitizers bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin und meiner Familie, die mich stets motiviert und unterstützt haben.

## 8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, Frau Dipl.-Ing. Andrea Völpel, Frau Silke Tonndorf-Martini, Dr. rer. nat. Andre Güllmar,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 30. September 2013

Stefan Kranz